



HAL
open science

Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'interaction nanovirus-insecte vecteur

Jérémy Di Mattia

► **To cite this version:**

Jérémy Di Mattia. Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'interaction nanovirus-insecte vecteur. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONTG021 . tel-03346452

HAL Id: tel-03346452

<https://theses.hal.science/tel-03346452>

Submitted on 16 Sep 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

En biologie des interactions : mécanismes des interactions parasitaires, pathogènes et symbiotiques

École doctorale GAIA – Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Unité de recherche PHIM – Plant Health Institute of Montpellier

Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'interaction nanovirus-insecte vecteur

Présentée par Jérémy DI MATTIA

Le 20 Mai 2021

Sous la direction de Stéphane BLANC
et le co-encadrement de Jean-Louis ZEDDAM

Devant le jury composé de

M. Henryk Hanokh CZOSNEK, Professeur émérite, Université hébraïque de Jérusalem

Mme Véronique BRAULT, Directrice de recherche, INRAE, Université de Strasbourg

Mme Anne-Sophie GOSSELIN-GRENET, Maître de conférences HDR, INRAE Université de Montpellier

Mme Sylvie GERMAN-RETANA, Directrice de recherche, INRAE, Université de Bordeaux

M. Stéphane BLANC, Directeur de recherche, INRAE, UMR PHIM

M. Jean-Louis ZEDDAM, Chargé de recherche, IRD, UMR PHIM

Rapporteur

Rapporteuse

Examinatrice

Présidente du jury

Directeur de thèse

Co-encadrant de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Remerciements

Il y a 4 ans je suis arrivé à l'UMR BGPI (maintenant devenu PHIM) pour un simple stage de Master 2. Un excellent encadrement et une détermination de continuer d'étudier l'incroyable mode de vie et surtout de transmission d'un virus multipartite m'ont conduit dans cette aventure extraordinaire qu'est la thèse et ces rencontres. Étant donné mon débit de parole conséquent, je vais tenter pour une fois d'aller à l'essentiel pour rendre en quelques lignes ce que l'ensemble des personnes que j'ai pu côtoyer m'ont apporté pour devenir l'homme et le scientifique que je suis aujourd'hui.

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury de thèse Anne-Sophie Gosselin Grenet, Véronique Brault, Sylvie German Retana ainsi que Henryk Hanokh Czosnek pour avoir accepté d'évaluer le manuscrit décrivant l'ensemble des travaux que j'ai réalisé durant ces 4 ans. Je remercie dans le même temps les membres de mon comité de thèse Mylène Ogliastro, Tania Timtchenko, Louis Lambrechts et Claire Neema pour m'avoir accompagné et aiguillé durant ma thèse.

Je remercie également les membres du service Handiversité de la Faculté des Sciences de Montpellier pour leur accompagnement sans faille durant mes 3 années de Licence, 2 années de Master ainsi que mes 3 ans et demi de thèse. Sans leur accompagnement moral dans les démarches administratives ainsi que dans l'obtention de logiciels m'aidant à corriger une partie de mes fautes d'orthographe je n'aurais pu réaliser un tel parcours.

De tout cœur, je souhaite remercier Romain Gallet, Jean-Louis Zeddami et Stéphane Blanc pour leur encadrement durant mon stage et/ou ma thèse. Romain, je te remercie de ton encadrement durant mon stage de Master 2. Je pense que grâce à toi j'ai appris une méthode de rédaction qui me servira pour l'ensemble de ma carrière scientifique. Des commentaires toujours imagés, qui je l'espère, ont été appliqués pendant l'écriture de cette thèse. Jean-Louis, notre collaboration a commencé au début de ma thèse. Tu es un encadrant exceptionnel autant au niveau humain qu'au niveau scientifique. Tu as su être présent tout en me laissant les libertés nécessaires pour réaliser cette thèse. Des centaines d'heures de discussions, des milliers de conseils ainsi que plusieurs milliers de fautes corrigées plus tard (oui le logiciel Antidotes n'est pas aussi doué que toi sur l'orthographe) tu

m'as en partie permis d'évoluer vers le scientifique que je suis. Stéphane, tout a commencé durant mon stage et tu as continué à diriger cette thèse. Tout comme Jean-Louis tu m'as laissé les libertés nécessaires à mon épanouissement. Tu m'as accompagné, conseillé et guidé durant toute cette thèse pour me permettre d'obtenir l'ensemble de mes résultats. Nous avons, je pense, un esprit de compétition similaire (merci pour tous ces moments de bonheur lorsque nous arrivions régulièrement à te battre au volley-ball le mardi et le jeudi midi) et une détermination sans faille. J'ai réalisé ma thèse en admirant le scientifique que tu es, un modèle à suivre pour le reste de ma carrière pour atteindre les objectifs que je me suis fixés. J'espère pouvoir continuer à me mesurer à toi au volley lorsque les conditions le permettront!

Je veux également dire un énorme merci à l'ensemble des personnes de l'ancienne équipe VIP (virus Interactions Pathogènes). Sophie Le-Blaye, je te remercie pour ton aide et le temps précieux que tu as su me faire gagner... et oui, plus de 30 000 fèves plantées et agro-inoculées plus tard, pour que j'obtienne l'ensemble de mes résultats, ça en fait de la fève ! Élodie Pirolle, je te remercie pour ton aide au laboratoire et pour les découvertes de jeux de société que j'ai pu faire grâce à toi ! Michel Yvon, merci de m'avoir bien dépanné lorsque j'avais besoin de conseils et de m'avoir autant fait rire durant ces 4 ans. Ne sois pas trop déçu de ne plus entendre ma magnifique voix résonner dans le labo 69 ! Marie-Stéphanie Vernerey, je ne te remercierai jamais assez de m'avoir formé à la microscopie confocale. C'est une technique et un microscope que j'ai toujours rêvé d'utiliser pour les photos magnifiques que l'on peut obtenir. Tu m'as accompagné et toujours bien conseillé pour réussir à prendre en main cet équipement. Merci Maryline Uzest, pour une brève, mais géniale collaboration pour écrire une revue, de nombreux match de volley, et d'avoir pris de plus le temps de répondre à l'ensemble de mes questions sur les pucerons et leurs interactions avec les virus. Je remercie également Michel Peterchmitt, Cica Urbino, Martine Granier, Bastien Cayrol pour leur aide durant les réunions du lundi matin et pour avoir toujours été présents lorsque j'avais des questionnements. Merci également à Marie Ducouso pour son aide et son expertise sur les interactions protéines-protéines. Je tiens à remercier Yannis Michalakis pour son aide dans certain de mes projets, j'ai vraiment adoré travailler avec toi. Une expérience très enrichissante.

Plus largement, je souhaite remercier l'ensemble du personnel de l'UMR BGPI/PHIM pour leurs gentillesse et leurs disponibilités. Je tiens tout particulièrement à remercier les

binômes Marlène Souquet et Élodie Pichon, Charlotte Julian et Laurence Blondin avec qui j'ai énormément discuté et ri ! Merci à Michel Amphoux pour l'ensemble des fois où tu m'as proposé... en vain, d'aller courir ensemble ! Merci à Romain Ferdinand pour toutes ces discussions sur le football et autres que nous avons eues et que j'ai énormément appréciés.

Merci également à tous les membres du Cirad de Baillarguet ayant participé à la session volley du mardi et du jeudi midi m'ayant permis de me défouler et de progresser dans ce sport. Dommage que la COVID nous ait empêché de poursuivre nos matchs intenses au cours de cette dernière année.

Je veux adresser un remerciement particulier à Faustine Rickebusch mon binôme de manip. Nous avons eu une collaboration exceptionnelle sur le plan humain et scientifique. Nous nous sommesentraîdés, encouragés et motivés l'un l'autre pour nous amener à nous surpasser dans nos thèses. Des chants sous la hotte aux cris de victoires dans la salle BET, ce fut un pur bonheur de travailler avec toi ! Le fait que tu finisses 1 an avant moi a laissé un vide dans ma thèse, mais je suis tellement fier de notre projet commun ayant amené à la publication qui représente aujourd'hui le chapitre 2 de cette thèse.

Comment conclure mes remerciements sans parler de l'ensemble des thésards et « jeunes » avec qui j'ai partagé cette thèse. Tout d'abord, merci à toutes mes collègues de bureau. Edwige Berthelot et Coralie Picard avec qui j'ai partagé la même pièce durant mes premiers pas à BGPI et qui m'ont permis de m'intégrer parfaitement au groupe « thésards », Faustine et Maëlle Deshoux avec qui j'ai partagé beaucoup d'espaces dans les laboratoires et de discussions, notamment sur le thème « bébé » avec Maëlle. De grandes chercheuses et de grandes femmes qui m'ont énormément aidé dans ma thèse. Merci enfin Margaux Jammes et Mélia Bonnamy, les petites dernières que j'ai pas mal embêtées dans le bureau et avec qui j'ai énormément apprécié rire et discuter. Mélia, je dirais juste « Mélia Ouh Ah Ah » et Margaux je retiens juste que j'ai toujours gagné au ping-pong... ou presque ! Babil Torralba, merci pour ton aide dans les manip du chapitre 3 de ma thèse. Les amis avec qui je n'ai pas eu la chance de partager un bureau je vous remercie également. Mes grands amis avec qui j'ai commencé, Thomas Dumartinet et Mathias Frontini avec qui nous avons partagé de grandes victoires de pétanque et pas mal de débats où j'ai pu rester neutre. Mes collègues de ping-pong également Florian Chariat et ses origamis, Céline Thivolle et nos

maux de mains, Marie Brevet et nos rigolades, Marie Le Naour qui ne retrouvera plus son bureau en désordre après mon départ, Rémi Pélissier avec qui on ne craint « dégun » et surtout allez l'OM, Valentin Guyot merci de tout ces fous rires partagés et de ces discussions scientifiques durant nos « réunions » ! Merci à Pascal Alonso pour notre entente au volley et ses conseils sur les enfants, Kévin Gauthier pour les match de volley, Maud Thierry et Emeline Ricciuti pour nos discussions. Merci Alexandre Lassagne pour ce tour en vélo qui n'en a malheureusement pas appelé d'autres. Merci, Oumaïma Moubset d'être toujours souriante. Je remercie particulièrement Mathilde Villegas dont j'ai eu la chance d'encadrer le stage de Master 1 et d'aider un petit peu au début de sa thèse. J'ai pris énormément de plaisir à te rencontrer et notamment à corriger ton rapport de stage de M1 avec les petits commentaires qui nous ont bien fait rire.

Pour finir ces remerciements, j'aimerais adresser un mot à l'ensemble de ma famille et mes amis. Merci à Laura et Antho pour toutes ces après-midi, soirées, matinées, et autres moments de la journée à discuter et à jouer à des jeux ! Merci à toi Sophie d'avoir passer autant de temps chez nous, pour rire, critiquer, rire et surtout rire, #BKcesoir ! Merci à ma seconde famille. Mimi et Jean-Luc pour tout ce que vous apportez dans ma vie, Anaïs avec qui ont se supporte mutuellement et avec qui j'adore me chamailler! Nath, Nico, Aimée, Jeannine, Fanny et Guillaume, Paul et Romane avec qui j'adore passer du temps lors des repas de famille.

Merci à ma famille à qui je dois tout. Merci, Papa et Maman pour tout ce que vous avez fait, faites et ferez dans ma vie. Je suis l'homme que je suis grâce à vous !! Ju merci de tous nos moments passés ensemble et que je n'échangerais contre rien au monde. Merci Elo, une petite sœur d'exception pour un partage exceptionnel. Merci, Maxouuuuu pour tous ces fous rires. Merci à vous deux de faire de moi le parrain de Timéo dont j'attends l'arrivée avec grande impatience #bisous de parrain pour le jour où tu liras... ou pas cette thèse!!! Merci à mes deux grand père pour tout ce qu'ils m'apportent.

Comment finir ces remerciements sans parler des deux femmes qui partagent ma vie au quotidien. Manon, ma femme, ma vie. Tu me supportes au quotidien et durant cette thèse tu m'as permis de réaliser de grandes choses comme dans ma vie. Flora, ma fille, cela fait peu de temps que tu es dans ma vie, mais tu l'as remplie déjà d'un bonheur infini.

Tout simplement MERCI et n'oubliez pas de garder toujours le sourire :D.

Table des matières

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	8
LISTE DES ABREVIATIONS ET DES ACRONYMES.....	12
LISTE DES ESPECES VIRALES CITEES.....	16
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	20
INTRODUCTION	30
1. <i>Transmission virale de plante à plante par vecteur</i>	34
2. <i>Le mode de transmission non circulant</i>	36
3. <i>Les modes de transmission circulants multipliant et non multipliant</i>	42
4. <i>Objectifs de la thèse</i>	66
TRAVAUX DE THESE	70
CHAPITRE 1 : DETERMINATION DU TRAJET DU VIRUS DANS LE PUCERON ET ROLE DE LA PROTEINE NSP DURANT CETTE ETAPE	70
1. <i>Généralité sur les pucerons</i>	71
2. <i>L'intestin des pucerons</i>	76
3. <i>Les glandes salivaires du puceron</i>	76
4. <i>Les pucerons vecteurs du FBNSV</i>	78
5. <i>Article : Route of a Multipartite Nanovirus across the Body of Its Aphid Vector</i> <i>(publié dans Journal of Virology)</i>	82
6. <i>Travaux complémentaires à l'article 1</i>	100
7. <i>Conclusions et discussions</i>	106
8. <i>Références hors article</i>	108
CHAPITRE 2 : LA CO-ACQUISITION D'UN NANOVIRUS ET D'UN GEMINIVIRUS MONTRE UNE LOCALISATION DIFFERENTE DANS LEUR PUCERON VECTEUR COMMUN	112
1. <i>Mise en contexte et résumé</i>	113
2. <i>Article : Co-Acquired Nanovirus and Geminivirus Exhibit a Contrasted Localization</i> <i>within Their Common Aphid Vector (publié dans Viruses)</i>	115
3. <i>Conclusion et discussion</i>	130
4. <i>Références hors articles</i>	131
CHAPITRE 3 : LES MECANISMES DE LA TRANSMISSION PAR VECTEUR FAVORISERAIENT LE MAINTIEN DE L'INTEGRITE DU GENOME MULTIPARTITE DES NANOVIRUS	134
1. <i>Mise en contexte et résumé</i>	135

2. Article : <i>Non-concomitant host-to-host transmission of a multipartite virus genomic segments may lead to complete genome reconstitution.</i>	140
3. <i>Conclusions et discussions</i>	166
4. <i>Références hors article</i>	169
CHAPITRE 4 : RECHERCHE DE PARTENAIRES CELLULAIRES DES PROTEINES NSP ET CP	172
1. <i>Mise en contexte</i>	173
2. Article : <i>Y2H search for proteins of aphid midgut as candidate receptors for the transmission of faba bean necrotic stunt virus</i>	177
3. <i>Essais de validation des interactions détectées avec le système Y2H.</i>	192
4. <i>Tentative de co-localisation de SCAMP et de l'ADN viral dans le puceron</i>	198
5. <i>Recherche du trajet subcellulaire du FBNSV dans l'AMG de A. pisum</i>	200
6. <i>Conclusion</i>	206
7. <i>Références hors article</i>	207
CHAPITRE 5 : MODE D'ACTION DES FACTEURS ASSISTANTS DANS LES DIFFERENTS MODES DE TRANSMISSION DES VIRUS DE PLANTES PAR VECTEURS	210
1. <i>Mise en contexte</i>	211
2. <i>Revue</i> :	212
3. <i>References</i>	232
CONCLUSION GENERALE : SCHEMAS BILAN DE L'INTERACTION ENTRE LE FBNSV ET LES PUCERONS VECTEURS	240
REFERENCES HORS CHAPITRE	245
ANNEXES	258
GENE COPY NUMBER VARIATION AND GENE EXPRESSION MODULATION IN A MULTIPARTITE VIRUS	258
1. <i>Abstract</i>	258
2. <i>Introduction</i>	259
3. <i>Materials and Methods</i>	261
4. <i>Results</i>	268
5. <i>Discussion</i>	270
6. <i>References</i>	273
7. <i>Figure legends</i>	276
8. <i>Supplementary information</i>	278
LISTE COMMUNICATIONS ORALES ET PUBLICATIONS	292

Liste des abréviations et des acronymes

3-AT : 3-amino-1,2,4-triazole

AAP : Acquisition access period

Ade : Adenine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AMG : Anterior midgut

ARN : Acide ribonucléique

ASG : Accessory salivary gland

BiFC : Bimolecular fluorescence complementation

CP : Coat protein

CPZ : Chlorpromazine

CRA : Common region A

CRB : Common region B

Cub : C-terminal part of ubiquitin

CypB : Cyclophiline B

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DYN : Dynasore

FISH : fluorescence in situ hybridization

FITC : fluorescein isothiocyanate

GST : glutathione s transferase

HC : Helper component

HC-Pro : Helper component proteinase

His :Histidine

Hsp70 : Heat shock protein

IAP : Inoculation access period

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

IR : Intergenic region

Leu : Leucine

LiOAc : Lithium acetate

LIR : Long intergenic region

M-rep : master rep

MG : midgut

MGP : Midgut protein

MP : movement protein

NGS : Next Generation Sequencing

NPV : Nonpersistent stylet borne viruses

NSP : Nuclear shuttle protein

Nub : N-terminal part of ubiquitin

ORF : Open reading frame

Ost4 : Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit

P50 : Protein 50

PCNA : proliferating cell nuclear antigen

PCR : Polymerase chain reaction

PCV : Persistent circulative (mostly nonpropagative) viruses

PEG : Polyethylene glycol

PGRP : protéine de reconnaissance des peptidoglycanes

PMG : posterior midgut

PPV : Persistent propagative viruses

PSG : Primary/principal salivary gland

qPCR : quantitative polymerase chain reaction

RAB : Ras-associated binding

RE : Réticulum endoplasmique

REn : replication enhancer protein

Rep : replication-associated protein

SaM35 : Sorting assembly machinery 35 kDa subunit

SaM50 : Sorting assembly machinery 50 kDa subunit

SCAMP : Secretory carrier-associated membrane protein

SG : Salivary gland

SIR : Short intergenic region

SPV : Semipersistent foregut-borne viruses

TA : Transmission activation

TB : Transmission body

TMEM 256 : Transmembrane protein 256

TMEM165 : Transmembrane protein 165

TrAP : transcriptional activator protein

Trp : Tryptophan

UPB : Ubiquitin protease

VP16 : Herpes simplex virus protein vmw65

VPg : Virus protein linked to the genome

Y2H : yeast two-hybride system

Liste des espèces virales citées

ABTV : *Abaca bunchy top virus*

ALCV : *Alfalfa leaf curl virus*

ArMV : *Arabis mosaic virus*

BBTV : *Banana bunchy top virus*

BCMV : *Bean common mosaic Virus*

BDMV : *Bean dwarf mosaic virus*

BMLRV : *Black medic leaf roll virus*

BNYVV : *Beet necrotic yellow vein virus*

BSMV : *Bett soil-borne mosaic virus*

BWYV : *Beet western yellow virus*

BYDV : *Barley yellow dwraf virus*

CABYV : *Cucurbit aphid-borne yellow virus*

CaMV : *Cauliflower mosaic virus*

CBDV : *Cardamom bushy dwarf virus*

CMV : *Cucumber mosaic virus*

CYDV : *Cereal yellow dwraf virus*

FBNSV : *Faba bean necrotic stunt virus*

FBNYV : *Faba bean necrotic yellow virus*

FBYLV : *Faba bean yellow leaf virus*

GFLV : *Grapevine fanleaf virus*

LBVaV : *Lettuce big-vein associated virus*

MPyV : *Mouse polyomavirus*

MSV : *Maize streak virus*

MVDV : *Milk vetch dwarf virus*

PEBV : *Pea early browning virus*

PEMV : *Pea enation mosaic virus*

PeWBVYV : *Pepper whitefly-born vein yellows virus*

PLRV : *Potato leafroll virus*

PNYDV : *Pea necrotic yellow dwarf virus*

PSSaV : *Parsley severe stunt associated virus*

PVY : *Potato virus Y*

PYSV : *Pea yellow stunt virus*

RSV : *Rice stripe virus*

SbDV : *Soybean dwarf virus*

SCSV : *Subterranean clover stunt virus*

SLRSV : *Strawberry latent ringspot virus*

SPMMV : *Sweetpotato mild mottle virus*

TMV : *Tobacco mosaic virus*

TNV : *Tobacco necrosis virus*

TRV : *Tobacco rattle virus*

TStV : *Tobacco stunt virus*

TuMV : *Turnip mosaic virus*

TuYV : *Turnip yellow virus*

TVMV : *Tobacco vein mottling virus*

TYLCV : *Tomato yellow leaf curl virus*

WSMV : *Wheat streak mosaic virus*

ZYMV : *Zucchini yellow mosaic virus*

Liste des figures et tableaux

Introduction.

Figure 1. Principaux groupes taxonomiques de virus de plantes.	29
Tableau 1. Caractéristiques de la transmission des virus de plantes par insectes hémiptères.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 2. Description des stylets et de l'alimentation des pucerons sur plante.	33
Tableau 2. Mode de transmission des virus de plantes par des groupes d'insectes de l'assemblage Paraneoptera.	35
Figure 3. Différents trajets suivis par les virus de plante selon leur mode de transmission. .	37
Tableau 3. Virus transmis de manière circulante multipliante par différents insectes du groupe Paraneoptera.	Erreur ! Signet non défini.
Tableau 4. Virus transmis de manières circulante non multipliante par différents insectes du groupe Paraneoptera.	43
Figure 4. Dendrogramme phylogénétique et organisation génomique des virus de la famille <i>Luteoviridae</i>	43
Figure 5. Circulation dans l'insecte vecteur des virus des familles <i>Luteoviridae</i> (A-C), <i>Geminiviridae</i> et <i>Nanoviridae</i> (C)	45
Figure 6. Organisation génomique et particules virales dans la famille <i>Geminiviridae</i>	49
Figure 7. Localisation d'un géminivirus (<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> - TYLCV) dans le système digestif de son vecteur <i>Bemisia tabaci</i>	51
Figure 8. Visualisation au microscope confocal de l'entrée et de l'accumulation du TYLCV dans les glandes salivaires principales de <i>B. tabaci</i>	53
Figure 9. Arbre phylogénétique, visualisation des particules virales et observation des symptômes causés par les virus appartenant à la famille des <i>Nanoviridae</i>	57
Figure 10. Organisation génomique et interaction entre les protéines des virus de la famille des <i>Nanoviridae</i>	59
Figure 11. Localisation et transmission d'un virus multipartite.	61
Figure 12. Localisation par immunofluorescence de la protéine de capsid du BBTV dans le système digestif et les glandes salivaires du vecteur <i>Pentalonia nigronervosa</i>	63

Chapitre 1. détermination du trajet du virus dans le puceron et rôle de la protéine NSP durant cette étape

Figure 1. Cycle de vie d'un puceron.	71
Figure 2. Description anatomique du corps d'un puceron.	73
Figure 3. Description de l'intestin moyen antérieur et des glandes salivaires du puceron <i>Myzus persicae</i>	75
Figure 4. Localisation des effecteurs salivaires C002 et ARMET dans les glandes salivaires principales de leurs pucerons respectifs.	77
Figure 5. Photo des pucerons décrits comme vecteurs du FBNSV.	77

Article : Route of a Multipartite Nanovirus across the Body of Its Aphid Vector

Figure 1 Genome organization of <i>Faba bean necrotic stunt virus</i> (FBNSV).....	87
Figure 2 Localization of the DNA segments of <i>Faba bean necrotic stunt virus</i> (FBNSV) in aphid versus that in plant cells.....	89
Figure 3 Colocalization of FBNSV segments in AMG and PSG.	90
Figure 4 Localization of FBNSV DNA, CP, and NSP in AMG and PSG of <i>A. pisum</i>	91
Figure 5 NSP-dependent accumulation of FBNSV DNA in the AMG of aphid vector.....	92
Table 1 List of primers.....	96

Figure 6. Immunolocalisation des protéines CP et NSP par microscopie électronique à transmission dans des intestins d' <i>A.pisum</i> virulifères et non virulifères.	101
--	-----

Tableau 1. Liste et photos non exhaustives de vésicules multimembranaires présentant des similitudes avec les structures observées dans la figure 6.....	105
--	-----

Chapitre 2. la co-acquisition d'un nanovirus et d'un géminivirus montre une localisation différente dans leur puceron vecteur commun.

Article : Co-Acquired Nanovirus and Geminivirus Exhibit a Contrasted Localization within Their Common Aphid Vector

Figure 1. Localization of FBNSV and ALCV DNA in broad bean host plants.	121
Figure 2. Accumulation of FBNSV and ALCV in aphid vectors.	122
Figure 3. Localization of ALCV and FBNSV DNA in anterior midgut cells of <i>A. craccivora</i> ...	123
Table 1. FBNSV and ALCV DNA detection in broad bean leaf discs after aphid inoculation.	124
Table 2. Co-transmission testing of FBNSV and ALCV.....	125

Chapitre 3. les mécanismes de la transmission par vecteur favoriseraient le maintien de l'intégrité du génome multipartite des nanovirus

Article : Non-concomitant host-to-host transmission of a multipartite virus genomic segments may lead to complete genome reconstitution

Figure 1. Schematic of the experimental design of "parallel" and "sequential" acquisition/transmission tests.....	143
Figure 2. Proportion of infected plants (red), plants where all three segments are found (reconstitution, yellow) and their ratio as a function of the transmission mode (parallel, left of the thick black vertical line; sequential, to the right of this line) and the segments	

involved (parallel: only U4 and C; sequential: either U4 and C, left of the thick grey line; or N and U4, right of the thick grey line).....	150
Figure 3. Proportion of infected plants (red) and plants where all three segments are found (reconstitution, yellow) as a function of time spacing (top x-axis) for the different segment and order combinations.	152
Figure 4: localization of sequentially acquired DNA segments of FBNSV in aphid anterior midgut (AMG) cells.	156
Figure S1: localization of FBNSV segments in aphid AMG cells. Viral DNA is labeled by FISH in the AMG of viruliferous aphids.	157
Figure 5. Schéma descriptif des tests de transmission effectués pour la recherche d'un éventuel phénomène de blocage de la seconde acquisition du FBNSV après purge sur une plante saine.	167

Chapitre 4. recherche de partenaires cellulaires des protéines NSP et CP

Figure 1. Principe du système double hybride DUALHunter.	175
---	-----

Article : Y2H search for proteins of aphid midgut as candidate receptors for the transmission of faba bean necrotic stunt virus

Table 1. Primers used in this study.....	179
Table 2. Components (amino acids and nucleobase) of drop-out plates.	179
Figure 1. Expression of NSP* and CP-fusion proteins.	181
Table 3. Validated Y2H NSP-interacting candidates	183
Table 4 Validated Y2H CP-interacting candidates.....	183
Table S1. List of the gene candidates found in yeast colonies for the NSP-bait protein	190
Table S2. List of the gene candidates found in yeast colonies for the CP-bait protein.....	191
Figure 2. Western Blot des peptides candidats produits dans les bactéries Rosetta II.	193
Figure 3. Schématisation d'une protéine de la famille SCAMP.	195
Figure 4. Marquage simultané de l'ADN du FBNSV (par FISH – vert) et de la protéine Scamp (immunolocalisation – rouge).	194
Figure 5. Schéma simplifié d'une cellule présentant les structures cellulaires ciblées durant cette étude.	199
Figure 6. Localisation de protéines et d'organites impliqués dans la voie endocytaire (endosomes précoces, tardifs et lysosomes) dans l'intestin moyen d' <i>A. pisum</i>	201
Figure 7. Co-marquage de la protéine virale NSP du FBNSV et de certains compartiments cellulaires (lysosomes, endosomes précoces, réticulum endoplasmique et mitochondries) dans les cellules intestinales d' <i>A. pisum</i>	203
Tableau 5. Liste des anticorps/marqueurs testés chez les pucerons.	205

Chapitre 5. mode d'action des facteurs assistants dans les différents modes de transmission des virus de plantes par vecteurs

Article : The helper strategy in vector transmission of plant viruses

Figure 1: Schematization of the HC mode of action for noncirculative viruses transmitted by aphids.	220
At the tip of the aphid stylets, the acrostyle harbors cuticular proteins named Stylins (left). All known Stylet-HC-virus particles interactions and the involved protein domains (when identified) are detailed on the right.	220
Figure 2: Schematization of the hypothetical mode of action of HC for circulative viruses transmitted by hemipeteran insects.....	225
The mode of action of HC in circulative propagative transmission of tenuiviruses is summarized on the left. The mode of action of the HC of circulative non propagative nanoviruses is shown on the right.	225
Table 1: Helper components in distinct plant virus families	231

Conclusion générale. Schémas bilan de l'interaction entre le FBNSV et les pucerons vecteurs

Figure 1. Schéma bilan de mes travaux sur l'interaction entre le FBNSV et ses insectes vecteurs.	242
---	-----

Annexes.

Article : Gene copy number variation and gene expression modulation in a multipartite virus

Figure 1: Correlations between the relative frequency of FBNSV genome segments and that of their respective mRNAs.....	276
Figure 2: Radar plot of FBNSV DNA and RNA formulas in trial A (Experiment 1).	277
Table 1: Statistical analysis of the distance between DNA and between mRNA formulas in faba bean and medicago (Experiment 1, Trial A).	277
Table 2: Positions showing higher differentiation than expected by chance in at least 4 out of the 20 replicate populations (Experiment 2).	278
Figure S1: Specific quantification of FBNSV DNAs and mRNAs in infected plant tissues.	278
Figure S2: Correlations between the relative frequency of FBNSV genome segments and that of their respective mRNAs in Trial B of Experiment 1.	279
Figure S3: Radar plot of FBNSV genomic and mRNA formulas in trial B.....	280
Figure S4: Radar plot of FBNSV genome formula in faba bean and medicago.	281
Figure S5: Frequency of each of the eight candidate mutations before (faba bean) and after (medicago) aphid transmission in twenty independent viral populations (Experiment 2).	282

Figure S6: Correlation matrix confronting variations in mutation frequencies to variations in FBNSV segment frequencies.	283
Table S1: Correlations between the frequencies of FBNSV segments and their respective mRNA, in trial A and B of Experiment 1.	284
Table S2: Statistical analyses of the frequencies of the transcripts coded by the eight segments of FBNSV in Trial A and B of Experiment 1.	285
Table S3: Statistical analysis of the variation of mRNA concentrations (Experiment 1).	289
Table S4: Statistical analysis of the distance between DNA and between mRNA formulas in faba bean and medicago (Experiment 1, Trial B).	291

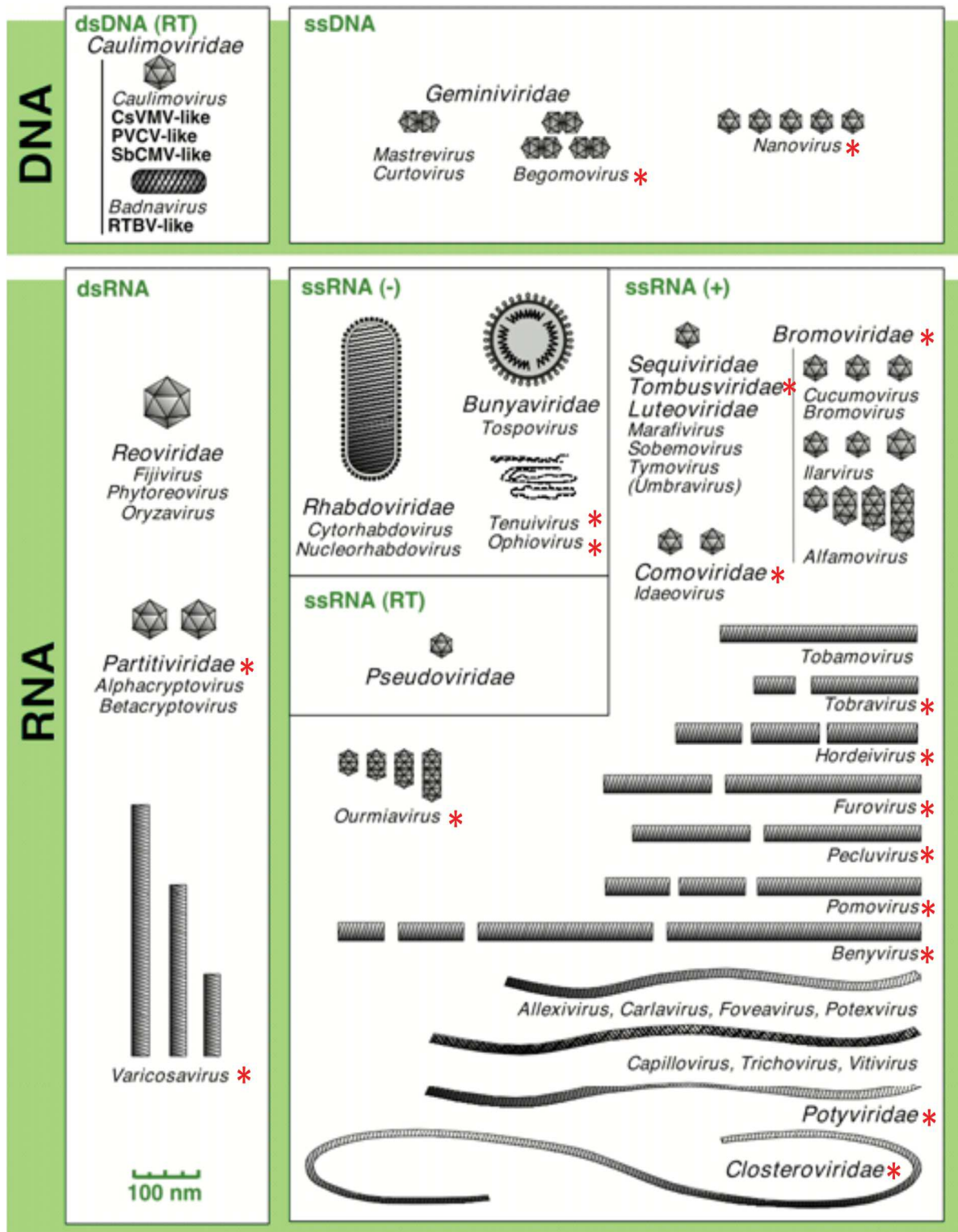


Figure 1. Principaux groupes taxonomiques de virus de plantes.

Tous les schémas sont approximativement à la même échelle, permettant de comparer la forme et la taille des particules virales. Seuls les genres représentatifs de la structure des espèces de la famille virales sont indiqués (la liste n'est donc pas exhaustive). Les familles et genres marqués d'un astérisque rouge présentent une organisation multipartite (NB : les familles *Tombusviridae*, *Potyviridae* et *Closteroviridae* ainsi que le genre *Begomovirus* sont composées de virus monopartites et multipartites. (adapté de Fauquet et al. 2005; Sicard et al. 2016)

Introduction

Il est généralement admis que tous les groupes taxonomiques d'organismes vivants peuvent être infectés par des virus. Les virus étant des parasites intracellulaires obligatoires, ils détournent la machinerie cellulaire de leurs hôtes à leur propre profit pour se multiplier de manière à maximiser leur chance de transmission. Les virus ont donc évolué au contact d'hôtes extrêmement différents (bactéries, protozoaires, levures, champignons, plantes, invertébrés et vertébrés) expliquant peut-être l'immense diversité virale connue, et celle qui reste encore à découvrir (**Figure 1 - (Fauquet et al. 2005)**). Les virus de plantes sont connus depuis longtemps, et c'est même chez les plantes que le concept de virus a initialement été défini (**Iwanowski 1903**). Dès le 17^{ème} siècle, des peintures faisaient référence à des maladies virales affectant les tulipes (**Parkinson 1629**). Le développement de techniques de plus en plus performantes, dont l'analyse aux rayons X et la microscopie électronique ont permis, dans les années 1930, d'observer pour la première fois un virus : celui de la mosaïque du tabac nommé *Tobacco mosaic virus* (TMV) (**Stanley 1935; Bawden et al. 1936; Eriksson-Quensel et Svedberg 1936; Kausche, Pfankuch, et Ruska 1939**). L'apparition de nouvelles techniques de plus en plus performantes comme le séquençage haut débit (NGS – Next Generation Sequencing) et la métagénomique virale permettent maintenant de décrire régulièrement de nombreux nouveaux virus (**Stobbe et Roossinck 2014**) et de découvrir l'ampleur incommensurable de la diversité virale existant sur la planète (**Anon 2011**).

Les plantes sont des organismes où chaque cellule est entourée d'une paroi pecto-cellulosique. Cette paroi joue le rôle de barrière de protection que les virus ne sont pas capables de traverser par leurs propres moyens (**Yarwood 1957**). Pour être transmis à une plante, un virus doit ainsi trouver une stratégie pour contourner l'obstacle que constitue cette paroi. Pour cela, les virus seront transmis d'un hôte à un autre soit de manière verticale en infectant par exemple le pollen ou les graines, auquel cas ils ne sortent pas de la cellule qu'ils infectent et/ou ne traversent pas la paroi, soit de manière horizontale par l'intermédiaire de l'homme (greffe, blessure sur les plantes) ou par des insectes vecteurs qui créent les brèches nécessaires dans la paroi (**Jeger 2020**). Un vecteur désigne tout organisme qui assure la transmission active d'un agent infectieux (pathogène ou non) d'un hôte à l'autre (qu'il soit animal ou végétal). La notion de transmission active impose que le vecteur, par son comportement, permette l'étape de transmission d'un agent infectieux en le prélevant dans un hôte et en le transmettant à un autre. L'agent infectieux peut, ou non, se multiplier dans le vecteur. Cette définition exclut donc la plupart des hôtes intermédiaires libérant passivement les agents infectieux dans l'environnement.

Tableau 1. Caractéristiques de la transmission des virus de plantes par insectes hémiptères.

Caractéristiques biologiques	Non persistants se fixant au stylet Secondes, minutes ^b	Non circulants se fixant dans l'oesophage Minutes, heures ^c	Persistants Circulant Heures, jours ^c	Persistants Multipliants Heures, jours ^c
AAP and IAP ^a	Secondes, minutes ^b	Minutes, heures ^c	Heures, jours ^c	Heures, jours ^c
Période de latence	Aucune	Aucune	Heures, jours	Jours, semaines
Temps de rétention dans le vecteur	Minutes, perdu après la mue	Heures, perdu après la mue	Jours, semaines	Durée de vie de l'insecte
Présence dans l'hémolymphe du vecteur	Non	Non	Oui	Oui
Multiplication dans le vecteur	Non	Non	Non	Oui
Transmission transovarienne	Non	Non	Non	Souvent

^aAAP, "Acquisition access period" – temps d'acquisition; IAP, "Inoculation access period" – temps d'inoculation;

^bTemps nécessaires pour que le virus soit acquis à partir de cellules de l'épiderme d'une plante et inoculé à d'autres

^cLes temps d'AAP and d'IAP dépendent de la localisation du virus dans la plantes, i.e., l'acquisition d'un virus dans le phloème prend plus de temps que l'acquisition d'un virus à partir de cellules de l'épiderme ou du mésophylle. Adapté de (Hogenhout *et al.* 2008).

Ce mode de transmission très répandu est au cœur de la lutte contre les maladies causées par les virus de plantes qui se traduisent par plus de 30 milliards de dollars de pertes économiques chaque année (**Sastry et Zitter 2014**). De nombreuses stratégies sont mises en place afin de contrôler ces vecteurs et ainsi éviter la dissémination des virus dans les cultures. Depuis longtemps, des traitements phytosanitaires à l'aide de produits chimiques sont appliqués pour éliminer ou réduire les populations de vecteurs et ainsi limiter la transmission (**Irwin 1999**). L'utilisation de ces produits chimiques est de plus en plus controversée en raison de l'impact négatif sur la biodiversité, l'environnement et la santé humaine (**Aktar, Sengupta, et Chowdhury 2009**). De plus, de nombreux virus ont la capacité d'être transmis par leur insecte vecteur dans des temps très courts (quelques minutes – voir section suivante et **Tableau 1** ; (**Hogenhout et al. 2008**). Dans ces cas-là, le bénéfice apporté par un traitement chimique est très limité car le vecteur peut avoir le temps de transmettre le virus avant que la mortalité provoquée par le produit appliqué apparaisse (**Thackray et al. 2000**). Pour s'affranchir de l'utilisation de ces pesticides, la recherche se tourne vers la compréhension de l'interaction entre les virus et leurs vecteurs. Le but est ici de ne s'attaquer ni au virus, ni au vecteur mais plus spécifiquement à l'interaction qui existe entre les deux.

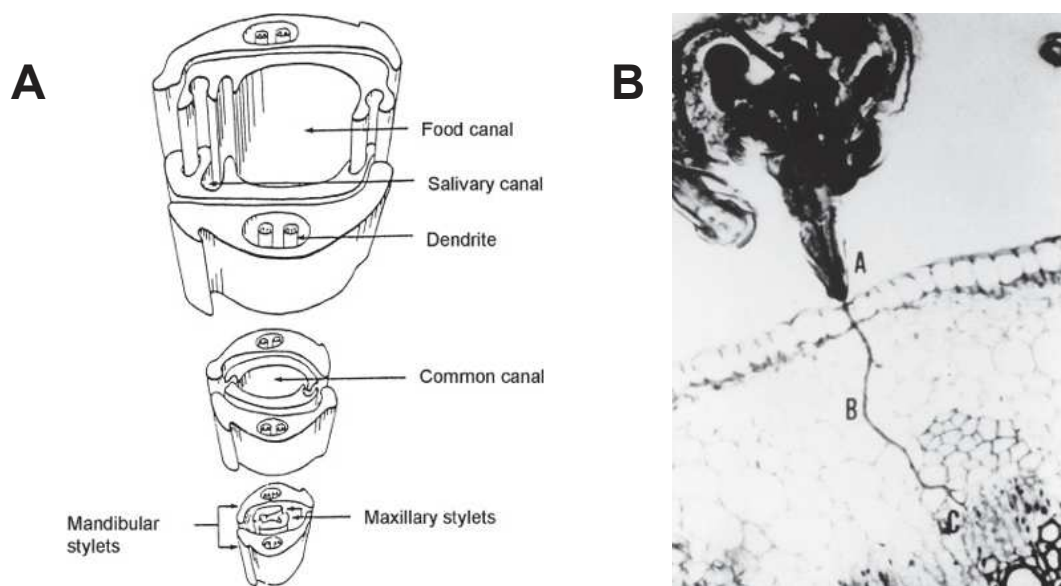


Figure 2. Description des stylets et de l'alimentation des pucerons sur plante.

A. Représentation schématique de la partie distale du faisceau de stylets du puceron *Myzus persicae*. Les trois sections transversales des stylets montrent la séparation des canaux alimentaire et salivaire (haut), qui fusionnent pour former le canal commun à l'extrémité distale (milieu), dont le diamètre se réduit pour former la pointe (bas). Les deux stylets mandibulaires entourent et protègent les deux stylets maxillaires (Uzest *et al.* 2010). B. Micrographie optique d'une coupe longitudinale du faisceau de stylets (et tête) et d'une feuille lors de l'alimentation d'un puceron sur une plante. Les stylets du puceron dépassent du proboscis (A) ; ils pénètrent à l'intérieur des cellules du mésophylle (B) et dans le faisceau vasculaire (C). (Gray et Banerjee 1999)

1. *Transmission virale de plante à plante par vecteur*

Les virus peuvent être transmis par des vecteurs appartenant à divers groupes taxonomiques (**Bragard et al. 2013**) tels que les oomycètes, les nématodes ou les arthropodes. Les mécanismes mis en place par les arthropodes dont les pièces buccales sont adaptées à un régime alimentaire de type « piqueur-suceur » (acariens, thrips, diptères et hémiptères) ont été abondamment étudiés. La majorité des vecteurs de virus de plantes sont des insectes hémiptères (**Gutiérrez et al. 2013; Dietzgen, Mann, et Johnson 2016**). De nombreuses études ont porté sur les pièces buccales de ces insectes afin de mieux comprendre leur mode d'alimentation (**Pollard 1977; Backus 1985; Hunter et Ullman 1992**). Pour se nourrir, ils utilisent un faisceau de stylets qui leur permet de traverser la paroi des cellules végétales (**Figure 2B - (Gray et Banerjee 1999)**). Plus précisément, cet appareil buccal se compose d'une paire de stylets mandibulaires en position externe et d'une paire de stylets maxillaires internes (**Figure 2A - (Forbes 1977; U zest et al. 2010)**). C'est grâce à ces appendices en forme d'aiguille que le vecteur va pouvoir percer la paroi de la cellule végétale. Cette action mécanique est généralement accompagnée de l'injection de salive, qui a une activité lubrifiante et enzymatique permettant la pénétration en profondeur vers les tissus vasculaires où circule la sève élaborée (**Prado et Tjallingii 1994; Martin et al. 1997; Powell 2005; Powell, Tosh, et Hardie 2006**). Au cours de ce processus, les tissus sont peu ou pas endommagés par le vecteur, et un virus inoculé dans une cellule en même temps que la salive peut ensuite s'y répliquer. Les hémiptères piqueurs suceurs regroupent un grand nombre d'espèces vectrices appartenant aux familles *Aleurodidae*, *Cicadellidae*, *Membracidae* et *Aphididae*, cette dernière comprenant le plus grand nombre de vecteurs de virus de plantes (**Tableau 2 - (Hogehout et al. 2008)**). Malgré la diversité importante des espèces vectrices (plus de 300 connues actuellement – (**Hogehout et al. 2008**)), on ne connaît qu'un nombre restreint de modes de transmission (**Tableau 1 et 2**). Historiquement, ces modes de transmission ont d'abord été classés selon des critères quantitatifs essentiellement basés sur la durée des périodes d'acquisition, de latence, de rétention et d'inoculation, donc sur le temps nécessaire au vecteur pour transmettre le virus (**Watson et Roberts 1939**). Les deux premiers modes de transmission décrits comprenaient les virus transmis avec des temps d'acquisition courts (se comptant en secondes ou minutes - mode de transmission non persistant) et ceux nécessitant des temps longs (se comptant en heures ou jours - mode persistant) (**Tableau 1 - (Hogehout et al. 2008)**). Quelques années plus tard, **Sylvester (1956)** a mis en évidence un troisième mode de transmission intermédiaire, le mode semi-persistant (temps d'acquisition compris entre quelques minutes et quelques heures (**Tableau 1 - (Blanc, Drucker, et U zest 2014)**)).

Tableau 2. Mode de transmission des virus de plantes par des groupes d'insectes de l'assemblage Paraneoptera.

Vecteurs		Mode de transmission					
Familles	Espèces	NPV ^a	SPV ^b	PCV ^c	PPV ^d	Totales	%
Hémiptère	Pucerons	161 ^e	19	12	5	197	49.4
	Mouches blanches	5	9	115 ^f	-	129	32.3
	Cicadelles	-	4	13	10	27	6.7
	Fulgores	-	-	-	18	18	4.5
	Autres hémiptère	2	9	1	-	12	3.0
Thysanoptère	Thrips	2	-	-	14	16	4.0
	Totales	170	41	141	47	399	
	%	42.6	10.3	35.3	11.8		

Les chiffres dans le tableau représentent le nombre ou le pourcentage d'espèces virales transmises par leurs vecteurs respectifs.

^aNPV, Virus non-circulants non-persistants se fixant aux stylets;

^bSPV, virus non-circulants semi-persistants se fixant dans l'oesophage;

^cPCV, virus circulants non-multipliant (non répliquative);

^dPPV, virus circulants multipliant;

^e Incluant 110 espèces virales appartenant au genre *Potyvirus*, famille *Potyviridae*;

^f Espèces virales appartenant au genre *Begomovirus*, famille *Geminiviridae*. Adapté de (Hogenhout *et al.* 2008)

Ce n'est que dans les années 1960-1970, avec l'essor de la microscopie électronique et de la biologie moléculaire, que la classification des modes de transmission a évolué vers des critères plus qualitatifs prenant en compte les interactions virus-vecteur (**Kennedy, Day, et Eastop 1962; Harris 1977**). Les modes de transmission ont alors été revus et renommés en fonction de la localisation et du cycle du virus dans le vecteur. Trois modes ont été définis (i) la transmission non circulante (regroupant les virus non persistants et semi-persistants), (ii) la transmission circulante multipliante et (iii) la transmission circulante non multipliante (les deux dernières catégories regroupant les virus persistants capables de traverser l'intestin pour passer dans l'hémolymphe puis les glandes salivaires avec ou sans réplication) (**Tableau 1 - Blanc, Drucker, et Uzest 2014; Whitfield, Falk, et Rotenberg 2015**). Ces modes de transmission sont détaillés dans les sections qui suivent.

En préalable, il est important de noter que, quel que soit le mode de transmission, un virus peut assurer la reconnaissance initiale de son vecteur suivant deux stratégies moléculaires distinctes. La première est la stratégie « capsidale ». Dans ce cas, les virus utilisent directement leur protéine de capsidale pour interagir avec un récepteur se trouvant chez le vecteur. La seconde est la stratégie « helper », où la protéine de capsidale est incapable d'interagir directement avec le récepteur. Le virus produit alors un facteur assistant (ou « helper ») permettant de réaliser un pont moléculaire entre le récepteur et la capsidale virale (**Froissart, Michalakis, et Blanc 2002**). Bien qu'elle apparaisse plus complexe sur le plan moléculaire, la stratégie helper est très répandue et a été décrite notamment dans les familles *Potyviridae*, *Caulimoviridae*, *Virgaviridae*, *Secoviridae* (transmis selon le mode non circulant), *Phenuiviridae* (transmis selon le mode circulant multipliant) et *Nanoviridae* (transmis selon le mode circulant non multipliant).

Mon travail de thèse ainsi que d'autres travaux publiés en parallèle par d'autres laboratoires questionnent la traditionnelle vision du mode d'action des facteurs assistants de la transmission (**cf. chapitre 5**). Pour cette raison, nous avons rédigé un article de synthèse qui propose une mise à jour des connaissances sur la stratégie helper et qui est l'objet du dernier chapitre de ma thèse.

2. Le mode de transmission non circulant

La transmission non circulante concerne tous les virus se fixant à l'extérieur du vecteur, sur des récepteurs localisés au niveau des pièces buccales ou de « l'œsophage » (**Ng et Falk 2006**). Les espèces virales transmises selon cette modalité appartiennent à différents genres : *Cucumo-* et *Alfamovirus* (famille *Bromoviridae*), *Carlavirus* (famille *Betaflexiviridae*),

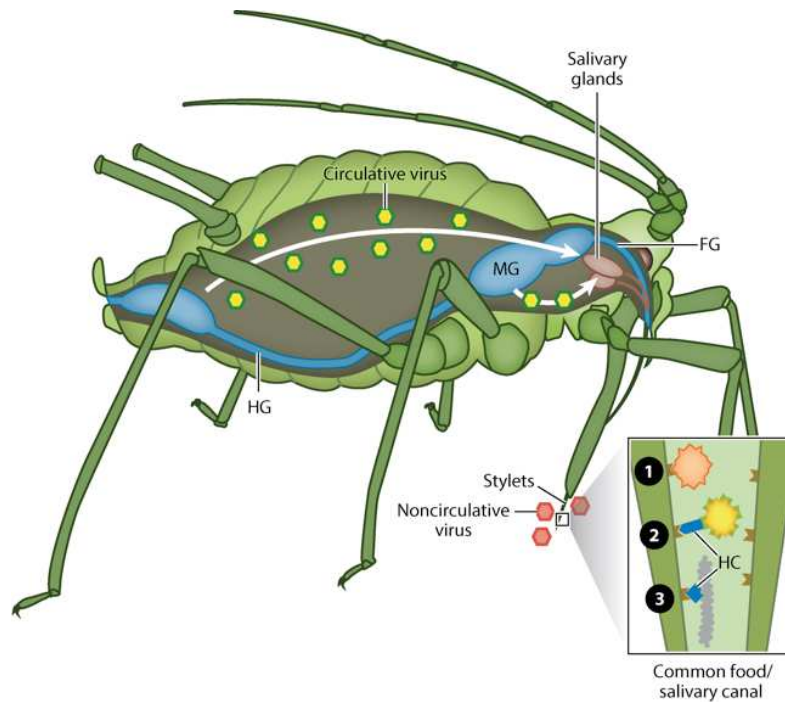


Figure 3. Différents trajets suivis par les virus de plante selon leur mode de transmission.

Les hexagones rouges représentent les particules de virus non circulants. Ces virus interagissent avec des récepteurs présumés présents au niveau de la cuticule des stylets. L'encadré en bas à droite représente les canaux alimentaire et salivaire qui sont fusionnés à l'extrémité des stylets maxillaires du vecteur. Selon la stratégie utilisée (capside (1) ou facteur assistant à la transmission pour le CaMV (2) et pour les potyvirus (3)), le virus se lie de manière directe ou indirecte à son présumé récepteur. Les hexagones jaunes dans le puceron représentent les particules de virus circulants. En bleu est représenté le système digestif (œsophage - FG pour foregut, intestin moyen antérieur et postérieur – respectivement MG pour midgut et HG pour hindgut) et en marron sont représentées les glandes salivaires du vecteur. Les flèches blanches montrent le trajet suivi par les virus circulants du système digestif vers les glandes salivaires. (Blanc, Drucker, et Uzest 2014)

Crinivirus (famille *Closteroviridae*) et *Caulimovirus* (famille *Caulimoviridae*) (**Pirone 1964; Govier et Kassanis 1974a, 1974b; Uzest et Blanc 2016**), mais c'est dans le genre *Potyvirus* (famille *Potyviridae*) que se trouvent le plus grand nombre (plus de 110 espèces ; **Tableau 1 ; (Hogenhout et al. 2008)**). Ces virus sont également qualifiés de virus non persistants (ou semi persistants) du fait qu'ils sont perdus par leur vecteur lors de la mue intervenant entre chaque stade de développement (**Ng et Perry 2004; Brault et al. 2010**). Ils ne sont donc pas transmissibles à vie par leurs vecteurs. Ils ont par ailleurs la particularité de pouvoir être transmis après des temps très courts d'acquisition (« acquisition acces period » en anglais - AAP) et d'inoculation (« inoculation acces period » - IAP) variant de quelques secondes à quelques heures au maximum, mis à part les cas dits semi-persistant où ces durées peuvent être un peu plus longue (**Tableau 1 & 2 ; (Hogenhout et al. 2008; Blanc, Drucker, et Uzest 2014; Fereres et Raccach 2015)**). Les particules virales peuvent se fixer sur les pièces buccales ou l'œsophage lorsque le flux d'alimentation passe dans ces organes puis se détacher lorsque le vecteur salive, ou lorsqu'il régurgite une partie du bol alimentaire (**Figure 3**). Les durées très courtes de ces AAP et IAP sont dues au fait que ces virus se localisent dans tous les tissus de la plante, et sont donc accessible dès les premières piqûres d'essai effectuées par le vecteur qui ont lieu dans des cellules du mésophylle situées peu profondément (**Brault et al. 2010**).

La transmission non circulante est la plus répandue chez les phytovirus, avec près de 53% des espèces décrites, dont 42.6 % retenus sur les stylets et 10.3 % dans l'œsophage (**Hogenhout et al. 2008**). C'est également la plus répandue chez les virus transmis par pucerons avec 161 espèces virales se fixant sur les stylets et 19 dans l'œsophage ; soit un total de 180 virus sur les 197 transmis par pucerons (**Tableau 1 - (Hogenhout et al. 2008)**). Les pucerons ne sont pas les seuls vecteurs transmettant des virus non circulants. Les mouches blanches (**Tian et al. 1999; Stewart et al. 2010; Chen et al. 2011**), les nématodes (**MacFarlane, Vassilakos, et Brown 1999; Brown et MacFarlane 2001**), ainsi que les oomycètes (**Campbell 1996**) ont été décrits comme vecteurs de ce type de virus. Les nématodes et les oomycètes transmettent ces virus suivant des modalités qui peuvent être « assimilées » à de celles connues chez les hémiptères. Par exemple, lors de l'acquisition par les nématodes, les *Tobravirus* et les *Nepovirus* (**Taylor et Brown 1997; Vellios, Brown, et MacFarlane 2002**) vont se fixer à la cuticule qui tapisse les pièces buccales ou de l'œsophage de la même manière que chez les arthropodes (**Taylor et Robertson 1970; MacFarlane et Robinson 2004**).

Tableau 3. Virus transmis de manière circulante multipliante par différents insectes du groupe Paraneoptera.

Familles virales	Genres viraux	Nombres	Hémiptère			Thrips
			Pucerons	Cicadelles	Fulgores	
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Tospovirus</i> ^a	14	-	-	-	14
<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Cytorhabdovirus</i> ^a	8 ^b	3	1	2	-
	<i>Nucleorhabdovirus</i> ^a	11 ^{b,c}	2	3	2	-
	<i>Unassigned</i> ^a	1 ^c	-	-	-	-
<i>Reoviridae</i>	<i>Fijivirus</i>	8	-	-	8	-
	<i>Oryzavirus</i>	2	-	-	2	-
	<i>Phytoreovirus</i>	3	-	3	-	-
<i>Tymoviridae</i>	<i>Marafivirus</i>	3	-	3	-	-
<i>Phenuiviridae</i>	<i>Tenuivirus</i>	4	-	-	4	-
TOTALES		41	5	10	18	14

^aVirus enveloppés;

^bLes insectes vecteurs de trois nucleorhabdovirus et deux cytorhabdovirus n'ont pas encore été identifiés;

^cUn nucleorhabdovirus, Coffee ringspot virus et le non assigné Orchid fleck virus sont transmis par des acariens de l'espèce *Brevipalpus phoenicis*,-Vecteur non identifié. Adapté de (**Hogenhout et al. 2008**).

Les oomycètes sont des vecteurs de virus appartenant notamment aux genres *Furo-* et *Bymovirus* (Campbell 1996; Singh, Verma, et Varma 2008). Ces virus s'adsorbent au niveau de la paroi des zoospores et y restent accrochés (Temminck, Campbell, et Smith 1970; Stobbs, Cross, et Manocha 1982). Une étude réalisée par Kakani, Reade, et Rochon (2004) a réussi à mettre en évidence que le *Cucumber necrosis virus* (CNV) nécessite un changement de conformation des particules virales pour permettre l'accrochage de celles-ci aux zoospores de l'oomycète vecteur *Oplidium bornovanus*. Cependant, les mécanismes d'acquisition et d'inoculation de ces virus par les oomycètes ne sont pas encore précisément caractérisés, même si la communauté scientifique pense qu'ils sont inoculés durant une période assez brève lors de la pénétration de l'oomycètes dans la cellule de la plante hôte (Campbell 1996).

En résumé, les mécanismes décrits pour la transmission par nématodes et pour certains cas de transmission par oomycètes semblent donc correspondre à une transmission non circulante avec une rétention à l'extérieur du vecteur, c'est-à-dire les pièces buccales ou l'œsophage pour les nématodes et la paroi des spores pour les oomycètes.

Une dernière catégorie de vecteurs semble également pouvoir être liée au mode de transmission non circulant. Il s'agit de la transmission par les insectes de type broyeur (lépidoptères, orthoptères, coléoptères). Ces insectes, et en particulier les coléoptères (Fulton, Gergerich, et Scott 1987), sont capables de transmettre des virus des genres *Tymovirus*, *Comovirus*, *Bromovirus* et *Sobemovirus*. Lorsqu'ils s'alimentent sur des plantes, ils vont mâcher les tissus végétaux (d'où l'appellation d'insectes broyeurs), et ceci va entraîner l'éclatement des cellules végétales infectées et la libération des particules virales au niveau des pièces buccales et du tube digestif de l'insecte. Lors du repas suivant sur une plante saine, ces vecteurs vont pouvoir inoculer le virus avec du régurgitat qui lubrifie les mandibules (transmission apparentée au mode non circulant). Les études réalisées sur de nombreux couples coléoptère/virus ont mis en évidence qu'il existe des interactions spécifiques et complexes (Fulton et al. 1987) car les coléoptères ne sont pas capables à chaque fois de transmettre le virus. De plus, certains virus ont été détectés dans l'hémolymphe de leur vecteur, sans toutefois pouvoir établir une relation claire entre cette présence dans l'hémolymphe et le succès de la transmission (Wang, Gergerich, et Kim 1994). Ces données appellent des recherches approfondies sur la possibilité d'une éventuelle transmission par coléoptères suivant le mode circulant.

Tableau 4. Virus transmis de manière circulante non multipliante par différents insectes du groupe Paraneoptera.

Familles virales	Genres Viraux	Nombres d'espèces de virus	Hémiptère			
			Pucerons	Cicadelles	Mouches blanches	Membracides
<i>Luteoviridae</i>	<i>Enamovirus</i>	5	5	-	-	-
	<i>Luteovirus</i>	13	13	-	-	-
	<i>Polerovirus</i>	7	6		1	-
<i>Geminiviridae</i>	<i>Becurtovirus</i>	3	-	3	-	-
	<i>Begomovirus</i>	424	-	-	424	-
	<i>Capulavirus</i>	4	4	-	-	-
	<i>Curtovirus</i>	3	-	3	-	-
	<i>Eragrovirus</i>	1	1	-	-	1
	<i>Grablovirus</i>	3	-	-	-	3
	<i>Mastrevirus</i>	41	-	41	-	-
	<i>Topocuvirus</i>	1	-	-	-	1
	<i>Turncurtovirus</i>	5	-	5	-	-
	<i>Nanoviridae</i>	<i>Nanovirus</i>	8	8	-	-
<i>Babuvirus</i>		3	3	-	-	-
TOTALES						

Adapté de (Hogenhout et al. 2008)

Cependant, le manque d'études sur la capacité qu'ont ces virus à passer les différentes barrières (intestin et glandes salivaires) de leur vecteur pour être inoculés en même temps que la salive du coléoptère lors des repas suivants ne permet pas de conclure définitivement sur le mode de transmission suivi.

3. Les modes de transmission circulants multipliant et non multipliant

a. Mode de transmission circulant multipliant

La transmission circulante se réfère à tous les virus capables de passer la barrière intestinale pour ensuite traverser l'hémolymphe et les glandes salivaires avant d'être inoculés, avec la salive, lors d'un repas de leur vecteur (**Figure 3 ; (Hogenhout et al. 2008; Bragard et al. 2013; Fereres et Raccah 2015; Dietzgen et al. 2016)**). Un temps de latence (temps nécessaire pour traverser l'intestin, se répliquer, puis transiter jusqu'aux glandes salivaires) de plusieurs heures à plusieurs jours est nécessaire avant que ces virus puissent être transmis (**Tableau 1 ; (Hogenhout et al. 2008; Dietzgen et al. 2016)**). L'AAP et l'IAP de ces virus sont en général plus longues que celles des virus non circulants. Ces virus s'accumulent dans l'insecte et sont souvent transmissibles durant toute la vie de leur vecteur (**Ammar el et al. 2009; Chen et al. 2011**).

Le mode circulant multipliant correspond exactement à ce qui est dénommé « transmission biologique » pour les arbovirus infectant les vertébrés, y compris l'homme (**Day et Bennetts 1954; Carn 1996; Blanc et Gutiérrez 2015**). En effet, les virions pénètrent dans les tissus des vecteurs et se répliquent dans un ou plusieurs organes cibles avant d'arriver dans les glandes salivaires (**Ammar el et al. 2009; Bragard et al. 2013**). Ils peuvent se répliquer dans des organes spécifiques du vecteur dans certains cas (par exemple dans les tissus nerveux pour les rhabdovirus), ou dans tous les organes dans d'autres cas, incluant les muscles, le corps gras et même les ovaires, ce qui peut se traduire par une transmission verticale du virus à la descendance (**Mao et al. 2019**). Les genres de virus de plantes concernés sont : *Cytorhabdovirus*, *Nucleorhabdovirus* (famille *Rhabdoviridae*), *Fijivirus*, *Phytoreovirus*, *Oryzavirus* (famille *Reoviridae*), *Tospovirus* (famille *Bunyaviridae*), *Tenuivirus* (famille *Phenuyviridae*) et *Marafivirus* (famille *Tymoviridae*) (**Tableau 3 - Hogenhout et al. 2008; Blanc, Drucker, et Uzest 2014**). Il est intéressant de noter que la quasi-totalité de ces familles virales contiennent aussi des espèces membres qui infectent les animaux. Cette observation a engendré l'idée assez généralement admise qu'il s'agit donc certainement à l'origine de virus d'insectes qui auraient secondairement acquis la capacité à infecter les plantes (**Gray et Banerjee 1999**).

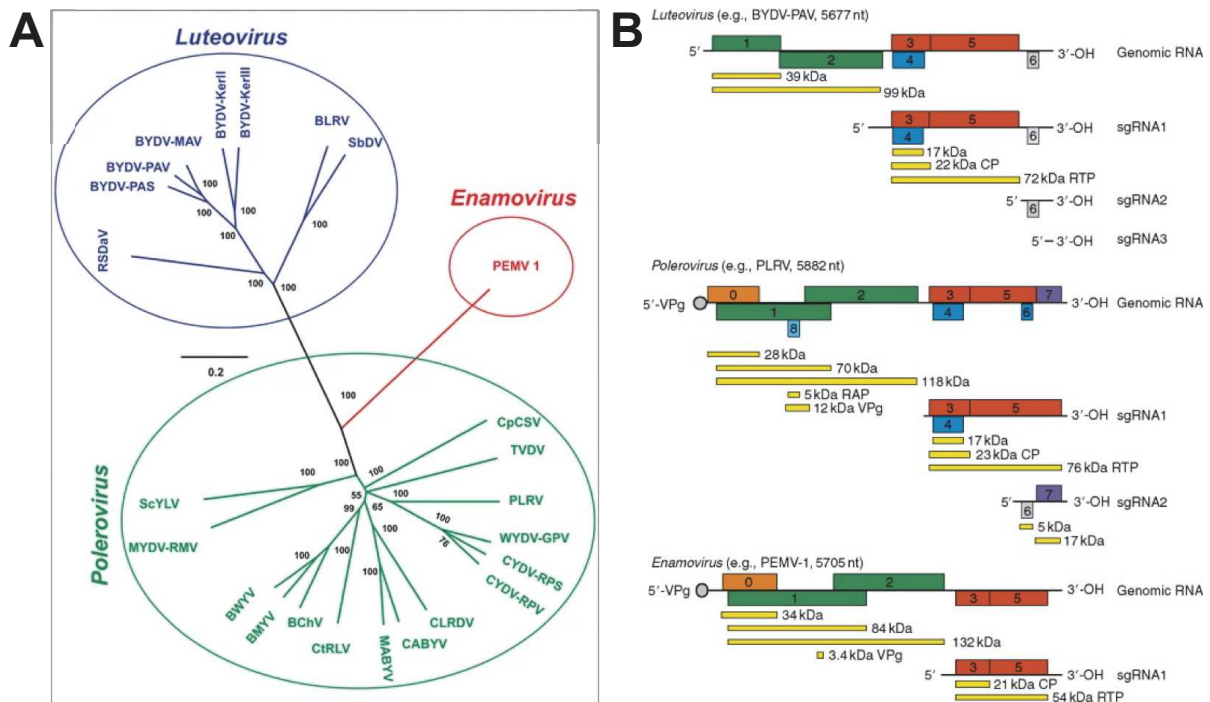


Figure 4. Dendrogramme phylogénétique et organisation génomique des virus de la famille *Luteoviridae*.

Dendrogramme phylogénétique basé sur l'alignement de séquences complètes de génome d'espèces virales appartenant à la famille *Luteoviridae* (Ali et al. 2018). B. Cartes des génomes des virus appartenant aux trois genres (*Luteovirus*, *Pterovirus* et *Enamovirus*). Les cadres de lecture (ORF) sont représentés en orange, vert ou rouge et sont numérotés. Les rectangles jaunes représentent les protéines codées pour chaque ORF dont le poids moléculaire est indiqué à droite. Les ORF 1, 2, 3 et 5 sont communs à tous les genres. L'ORF0 est impliqué dans l'accumulation des virus des genres *Enamo-* et *Pterovirus*, probablement au travers de son activité de suppression du RNA silencing (Mangwende et al. 2009; Kozłowska-Makulska et al. 2010). L'ORF1 code pour une polyprotéine chez les virus des genres *Enamo-* et *Pterovirus* contenant une protéase et la protéine de liaison à l'extrémité 5' de l'ARN génomique (VPg). L'ORF2 code pour une ARN polymérase ARN-dépendante. L'ORF3 code pour la principale protéine de capsid. L'ORF4 des virus des genres *Luteo-* et *Pterovirus* code pour une protéine indispensable au mouvement de cellule à cellule du virus lorsqu'il se trouve dans la plante. L'ORF5 joue un rôle dans la transmission puisqu'une mutation de la partie C-terminale de la séquence nucléotidique du PEMV-1 abolit la transmission par puceron de ce virus. Les fonctions des protéines codées par les ORF6 et 7 des virus des genres *Luteo-* et *Pterovirus* ne sont pas précisément connues mais des études par mutagenèse montrent un rôle dans la régulation de la transcription dans les infections tardives (Domier et D'Arcy 2008).

b. Mode de transmission circulant non multipliant

Trois familles regroupent la totalité des virus transmis selon le mode circulant non multipliant: *Luteoviridae*, *Geminiviridae* et *Nanoviridae* (**Tableau 4**). Ce mode de transmission est spécifique aux virus de plantes et n'a à ce jour été décrit qu'avec des hémiptères comme vecteurs (**Blanc et Gutiérrez 2015**). Les virus pénètrent dans le vecteur via l'intestin, transitent par l'hémolymphe et rejoignent les glandes salivaires (**Figure 3**) sans jamais se multiplier dans les organes traversés (**Bragard et al. 2013**). Si l'absence de réplication est le critère qui définit ce mode de transmission, elle est parfois contestée du fait de résultats contradictoires chez certains couples virus/vecteur. Mes travaux de recherche ont visé à mieux comprendre ce mode de transmission original, et en particulier chez les nanovirus où l'absence de réplication n'est pas à ce jour une certitude absolue (**Sicard et al. 2015**). Du fait même que l'étude de ce mode de transmission soit au cœur de mon travail de thèse, il est important de détailler les connaissances actuelles sur le sujet, et ce pour les trois familles virales concernées.

i. Famille *Luteoviridae*

La famille des *Luteoviridae* se subdivise en trois genres: *Enamovirus*, *Luteovirus* et *Polerovirus* regroupant ensemble plus d'une vingtaine d'espèces (**Figure 4A - Ali et al. 2018**). Ce sont tous des virus monopartites dont le génome est un ARN simple brin de polarité positive de 5,6 à 6 kb (**Figure 4B**), encapsidé dans une particule icosaédrique (symétrie T=3) non enveloppée de 25 à 30 nm de diamètre, composée de 180 molécules de protéine de capsid (CP) (**Miller, Liu, et Beckett 2002**). Les lutéovirus infectent de nombreuses plantes des familles *Poaceae* et *Fabaceae* (**Miller 1999**). Leur localisation est généralement restreinte au phloème: cellules du parenchyme phloémien, cellules compagnes et tubes criblés (**Barker et Smith 1999**). Une exception est le *Pea enation mosaic virus* qui peut aussi envahir le mésophylle (**de Zoeten et Skaf 2001**). Toutefois, ce virus est en fait un complexe de deux espèces appartenant à deux familles différentes : le PEMV-1 (*Enamovirus* - *Luteoviridae*) et le PEMV-2 (*Umbravirus* - *Tombusviridae*), dans lequel le PEMV-2 est encapsidé par la protéine de capsid du PEMV-1 (**de Zoeten et al. 2000; de Zoeten et Skaf 2001**).

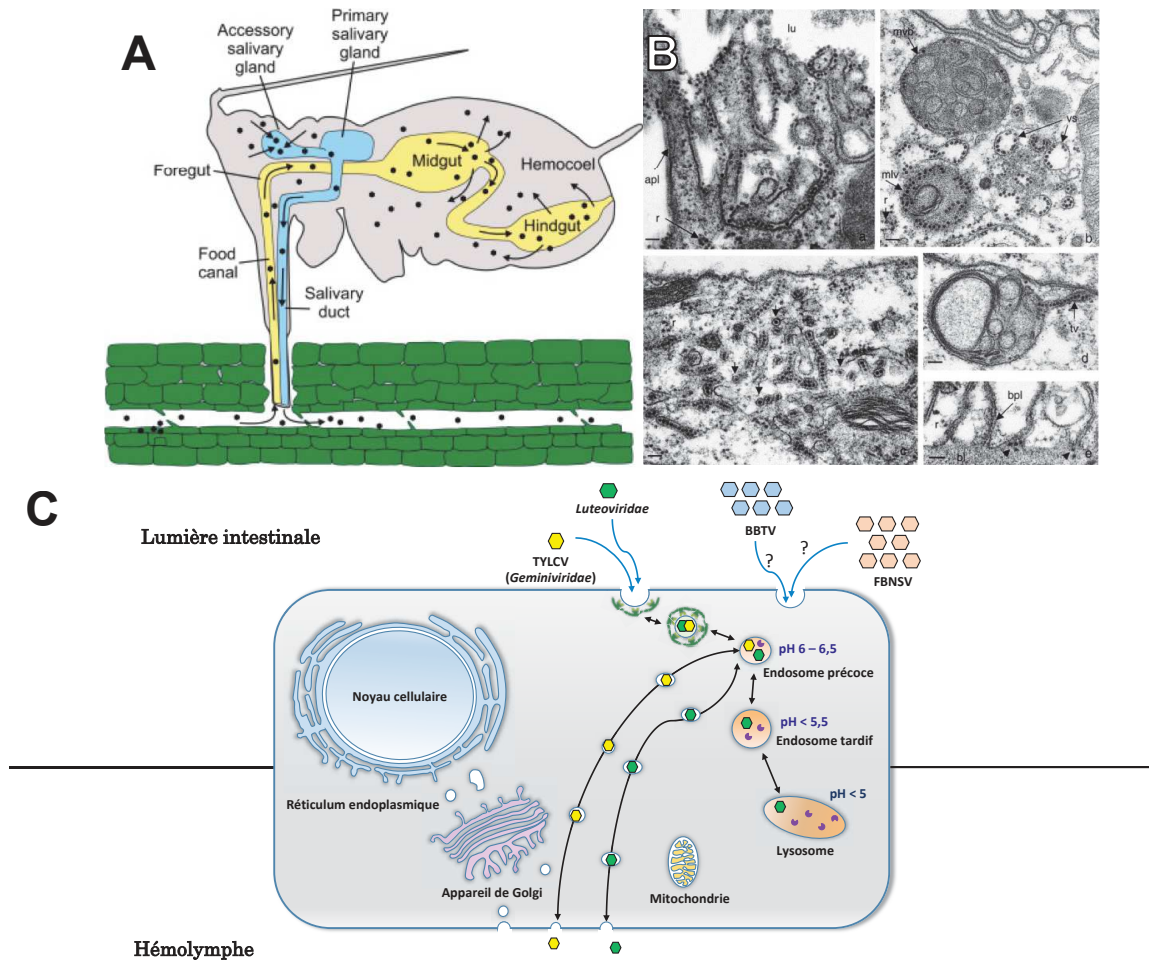


Figure 5. Circulation dans l'insecte vecteur des virus des familles *Luteoviridae* (A-C), *Geminiviridae* et *Nanoviridae* (C)

A. Représentation schématique de la circulation des *Luteoviridae* chez leurs vecteurs se nourrissant sur une plante infectée (vert). En jaune est représentée la voie d'entrée de ces virus dans le puceron avec le passage par le canal alimentaire présent dans le faisceau de stylets (Food canal) et l'œsophage (Foregut), puis le passage de la barrière intestinale au niveau de l'intestin moyen (Midgut) ou postérieur (Hindgut). Les particules virales diffusent alors dans l'hémolymphe (en gris) et pénètrent dans les glandes salivaires accessoires pour finalement être inoculées avec la salive (en bleu) (Domier et D'Arcy 2008) B. Visualisation au microscope électronique de particules du Beet western yellows virus (*Polerovirus*) dans les cellules intestinales du puceron *Myzus persicae*. Ces particules s'attachent aux microvillosités de l'intestin situées dans la partie apicale des cellules (Ba). Après endocytose, elles s'accumulent dans des structures de type endosome (Bb, flèches noires), puis dans des vésicules tubulaires contenant des « réseaux » de virions (Bc, flèches noires). Les vésicules tubulaires semblent parfois bourgeonner à partir des vésicules de type endosome (Bd, flèches noires). Particules de BWYV (flèches noires) localisées entre la membrane cytoplasmique (bpl) et la membrane basale (bl) dans une cellule de l'intestin moyen (be). (Brault et al. 2007). C. Schéma simplifié comparant les voies intracellulaires qu'empruntent les phytovirus de la famille des *Luteoviridae*, *Geminiviridae* et *Nanoviridae* (FBNSV et BBTV) dans les cellules intestinales de leur vecteur. \longleftrightarrow : transit des virus entre organites et vésicules. \bullet : hydrolases acides. \bullet : clathrine. TYLCV : *Tomato yellow leaf curl virus*. BBTV : *Banana bunchy top virus*. FBNSV : *Faba bean necrotic stunt virus*. Beet western yellow virus : BWYV.

Pendant longtemps, seuls les pucerons (*Aphididae*) étaient considérés comme pouvant transmettre les *Luteoviridae* (**Tableau 4**) (**Miller 1999; Ali et al. 2018**). Cependant, il a récemment été établi que le *Pepper whitefly-born vein yellows virus* (PeWBVYV - *Polerovirus*) est transmis par la mouche blanche *Bemisia tabaci* et non transmis par puceron (**Ghosh et al. 2019**). Les *Luteoviridae* ont la capacité de transiter et de s'accumuler dans l'intestin moyen et/ou l'intestin postérieur du vecteur (**Figure 5A - Brault, Herrbach, et Reinbold 2007**). Par exemple, le *Beet western yellow virus* (BWYV) et le *Potato leafroll virus* (PLRV) ont la capacité de pénétrer par l'intestin moyen (**Garret, Kerlan, et Thomas 1996; Gildow et al. 2000; Reinbold et al. 2001**) alors que le *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV) et le *Soybean dwarf virus* (SbDV) pénètrent par l'intestin postérieur (**Gildow 1985, 1987, 1993; Gildow et al. 2000**). Le *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) représente un cas particulier car il peut être internalisé à la fois au niveau de l'intestin moyen et de l'intestin postérieur (**Reinbold, Herrbach, et Brault 2003**). Les lutéovirus utilisent la stratégie capsidique pour interagir avec leur vecteur (**Brault et al. 2000; Peter et al. 2008; Gray, Cilia, et Ghanim 2014**). Des protéines membranaires ont été identifiées et proposées comme responsables de l'internalisation des *Luteoviridae* au niveau de l'intestin. L'aminopeptidase N (pour le PEMV – (**Linz et al. 2015; Tang et al. 2015**)) et le récepteur de l'éphrine (pour le *Turnip yellow virus* (TuYV) – (**Mulot et al. 2018**)) interagissent dans un système hétérologue (Double hybride en levure) avec la particule virale via la protéine de capsidique. L'implication de l'éphrine dans la transmission a ensuite pu être montrée à l'aide d'ARN double brin permettant d'inhiber la production de la protéine dans le puceron. Les pucerons s'étant nourris sur plantes produisant les ARN double brin ou sur une solution comportant ces ARNs transmettent moins bien le TuYV (ainsi que d'autres virus du genre *Polerovirus*) sans que cela affecte leur fécondité et leur capacité à se nourrir. A l'échelle cellulaire et tissulaire, la microscopie électronique à transmission (MET) a permis de préciser le trajet des *Luteoviridae* (**Figure 5B**). Les particules virales pénètrent dans la cellule intestinale par l'intermédiaire de vésicules recouvertes de clathrine qui vont transiter jusqu'aux endosomes (**Gray et Gildow 2003; Reinbold et al. 2003; Brault et al. 2007**). Les virions sont ensuite détectés dans les lysosomes (ils suivent donc cette voie de dégradation cellulaire) ou dans des vésicules permettant le transit direct des endosomes vers la membrane basale de l'intestin (**Figure 5C - Ali et al. 2018**). Chez les *Luteoviridae*, l'intestin n'est pas toujours considéré comme une barrière spécifique de la transmission. En effet, de nombreux virus de cette famille ont été observés dans l'hémolymphe de pucerons non vecteurs, indiquant que la barrière spécifique se place à un autre niveau, probablement les glandes salivaires (**Ali et al. 2018**).

Suite au passage de la barrière intestinale, les particules virales sont relarguées dans l'hémolymphe pour transiter jusqu'aux glandes salivaires (**Figure 5A**). La symbionine, homologue de la protéine GroEL d'*Escherichia coli* (**Ali et al. 2018**) est une protéine produite par l'endosymbionte primaire *Buchnera aphidicola* présent dans les bactériocytes (cellules spécialisées localisées dans l'hémoceole et comportant les endosymbiontes) du puceron (**Van den Heuvel, Verbeek, et van der Wilk 1994; Filichkin et al. 1997; Kliot et Ghanim 2013**). Il a été avancé que la symbionine permettrait au virus de transiter jusqu'aux glandes salivaires en étant protégé de toute attaque immunitaire dans l'hémolymphe (**Van den Heuvel et al. 1994; Filichkin et al. 1997**). Cependant, même si l'interaction entre GroEL et ces virus a bien été mise en évidence in vitro, son rôle dans la transmission est controversé car certains auteurs ont conclu que GroEL n'est pas sécrétée dans l'hémoceole (**Bouvaine, Boonham, et Douglas 2011**). De plus, **Liu et al. (2009)** démontrent que la transmission d'un PEMV possédant une protéine mutée dans la zone permettant l'interaction avec GroEL, n'est pas affectée. L'ensemble de ces résultats ne permet pas à ce jour de conclure et la controverse demeure (**Ali et al. 2018**).

Après le passage dans l'hémolymphe, les *Luteoviridae* passent dans les glandes salivaires accessoires (ASG) de leur vecteur (**Figure 5A - (Brault et al. 2007)**). L'entrée, le transit et la sortie des glandes salivaires accessoires mettent en jeu des mécanismes similaires à ceux décrits dans les cellules intestinales (**Gildow 1993; Garret et al. 1996; Reinbold et al. 2001, 2003**). La spécificité de la transmission des *Luteoviridae* est déterminée au niveau de ces ASG (**Gray et al. 2014**). Il a été établi que des protéines présentes dans cet organe impactent la transmission en interagissant avec le *Barley yellow dwarf virus* (BYDV)-GAV (transmis par le puceron *Sitobion graminum*) et le BYDV-MAV (transmis par le puceron *Sitobion avenae*) (**Gray et al. 2014**). En particulier, les protéines SaM35 et SaM50 interagissent, in vitro, avec les virions du BYDV-MAV. La co-acquisition d'un anticorps anti-SaM50 et du BYDV-MAV se traduit par une diminution de la transmission de ce virus par *S. avenae* (**Liu et al. 2009**). Par la même technique, **Wang et Zhou (2003)** avaient aussi montré que P50, une protéine de même poids moléculaire que SaM50, joue également un rôle au niveau des ASG durant la transmission du BYDV-GAV et du BYDV-MAV par leurs vecteurs respectifs. Après la traversée des ASG, les virions se retrouvent dans la salive de leur vecteur et peuvent être transmis à une nouvelle plante hôte (**Gildow 1993; Garret et al. 1996; Reinbold et al. 2001, 2003**).

Les lutéovirus n'ont jamais été décrits comme se répliquant dans leurs vecteurs, que ce soit dans les cellules intestinales, des glandes salivaires ou de tout autre organe (**Tamada et Harrison 1981; Ali et al. 2018; Gray et al. 2014**).

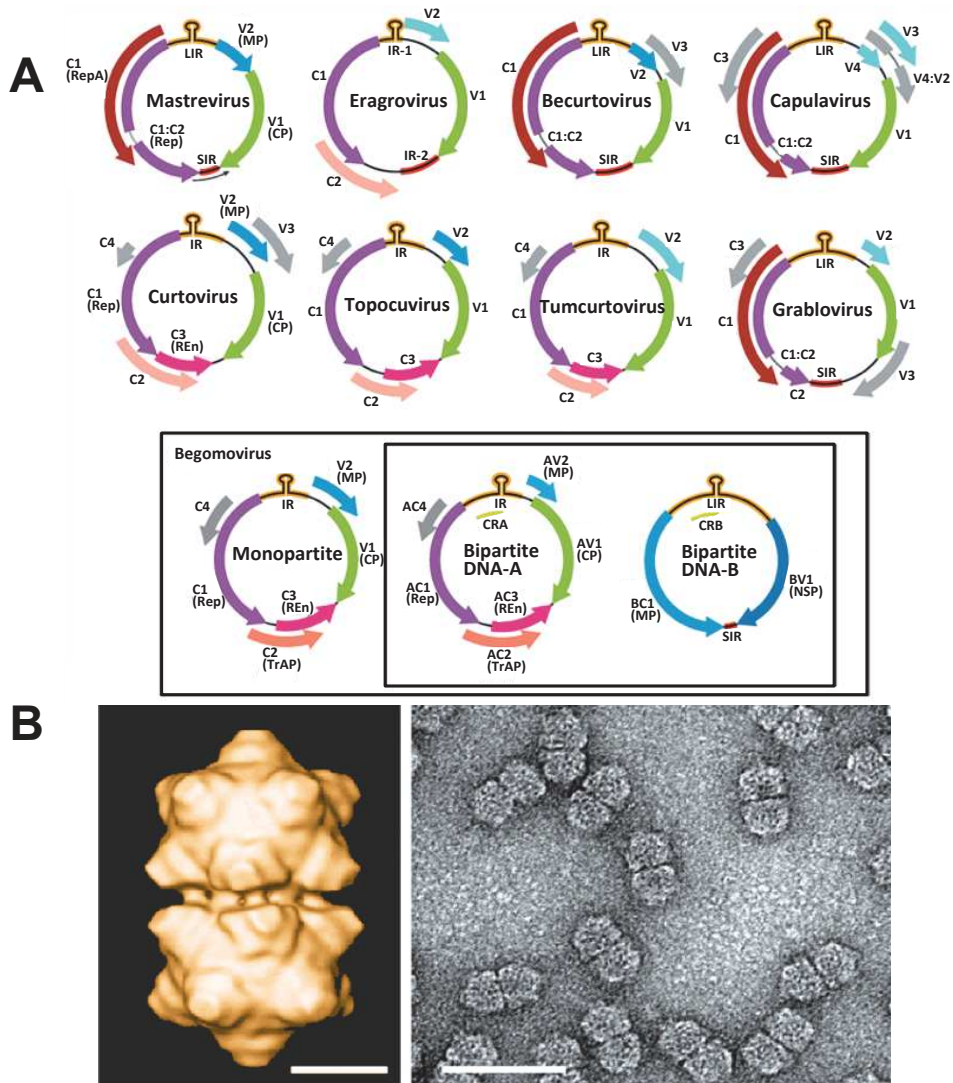


Figure 6. Organisation génomique et particules virales dans la famille Geminiviridae.

A. Organisation génomique des 9 genres de géminivirus. Les géminivirus possèdent un ADN simple brin circulaire. Sur l'ADN, les ORFs sont schématisés par des flèches orientées suivant le brin sens (V) ou anti-sens (C) et leurs protéines associées sont différenciées par la couleur de ces flèches. La tige-boucle qui permet l'initiation de la réplication est présente dans une région intergénétique de taille variable surlignée en jaune (IR ou LIR, respectivement région intergénétique ou longue région intergénétique). Certains génomes possèdent une seconde région intergénétique surlignée en rouge (SIR, courte région intergénétique). CRA et CRB, common regions A and B; CP, coat protein; MP, movement protein; NSP, nuclear shuttle protein; REN, replication enhancer protein; Rep, replication-associated protein; TrAP, transcriptional activator protein. B. Observation microscopique de particules de *Geminiviridae*. À gauche, une reconstruction d'une particule du *Maize streak virus* (MSV) à 25 angströms de résolution, établie grâce à la cryo-microscopie électronique. La barre blanche correspond à 10 nm. À droite, particules du MSV photographiées au microscope électronique après coloration négative. La barre blanche correspond à 50 nm. Ces deux images montrent la forme icosaédrique jumelée caractéristique des particules virales des *Geminiviridae* (Zhang, Wege, et Jeske et al. 2001).

Dans leur étude, **Tamada et Harrison (1981)** ont quantifié le *Potato leaf roll virus* (PLRV) dans le vecteur *Myzus persicae* après arrêt de l'acquisition. La quantité de virus dans l'insecte diminue au cours du temps ce qui les a conduit à affirmer que le virus ne se réplique pas dans l'insecte. Ce résultat a ensuite été cité dans de nombreuses revues comme preuve de la non-réplication des lutéovirus dans leurs vecteurs (**Gray et al. 2014; Ali et al. 2018**). A ce jour, les observations microscopiques (**Figure 5**) n'ont révélé des particules virales que dans des vésicules membranaires durant la transcytose, ce qui semble cohérent avec une absence de réplication puisque le virus ne serait pas en contact direct avec le cytosol.

ii. Famille *Geminiviridae*

La famille des *Geminiviridae* se subdivise en 9 genres viraux (**Figure 6A - ICTV 2019**) : *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* et *Turncurtovirus* regroupant un grand nombre d'espèces. Ces virus causent des dégâts à de nombreuses cultures d'intérêt agronomique telles le coton (**Briddon et Markham 2000; Thresh et Cooter 2005**), le maïs (**Shepherd et al. 2009**) et la tomate (**Moffat 1999; Lefeuvre et al. 2010**). Cette dernière espèce est notamment infectée par le *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) qui, au niveau mondial, cause des millions de dollars de pertes chaque année (**Ramesh et al. 2017**). Les géminivirus possèdent une double capsidie icosaédrique jumelée (d'où le nom de gemini = jumeau en latin) non enveloppée de 18 à 20 nm de diamètre pour environ 30 nm de longueur totale (**Figure 6B**) (**Zhang, Wege, et Jeske 2001; Jeske 2009**). Leur génome est constitué d'un ADN simple brin de 2,6 à 3 kb selon le genre. La plupart des géminivirus sont monopartites (**Hanley-Bowdoin et al. 2000**), les quelques exceptions se trouvant dans le genre *Begomovirus* où certaines espèces sont bipartites (génome A et B) (**Figure 6A - Bisaro et al. 1982; Rob W. Briddon et al. 2010**). Dans leur plante hôte, la majorité des géminivirus est limitée au phloème, mais certaines espèces ont la capacité d'envahir les cellules du mésophylle, tels le *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV - *Begomovirus bipartite* - (**Levy et Czosnek 2003**)) et le *Maize streak virus* (MSV - *Mastrevirus monopartite* - (**Lucy et al. 1996**)). À la différence des luteovirus quasi-exclusivement transmis par pucerons, la transmission des géminivirus a longtemps été décrite comme assurée par des vecteurs appartenant aux familles *Aleurodidae*, *Cicadellidae*, *Membracidae*, mais pas à la famille des *Aphididae* (**Tableau 4**). Ce n'est que récemment que les espèces du genre *Capulavirus* ont été décrites comme exclusivement transmises par pucerons, en particulier par *Aphis craccivora* (**Roumagnac et al. 2015**).

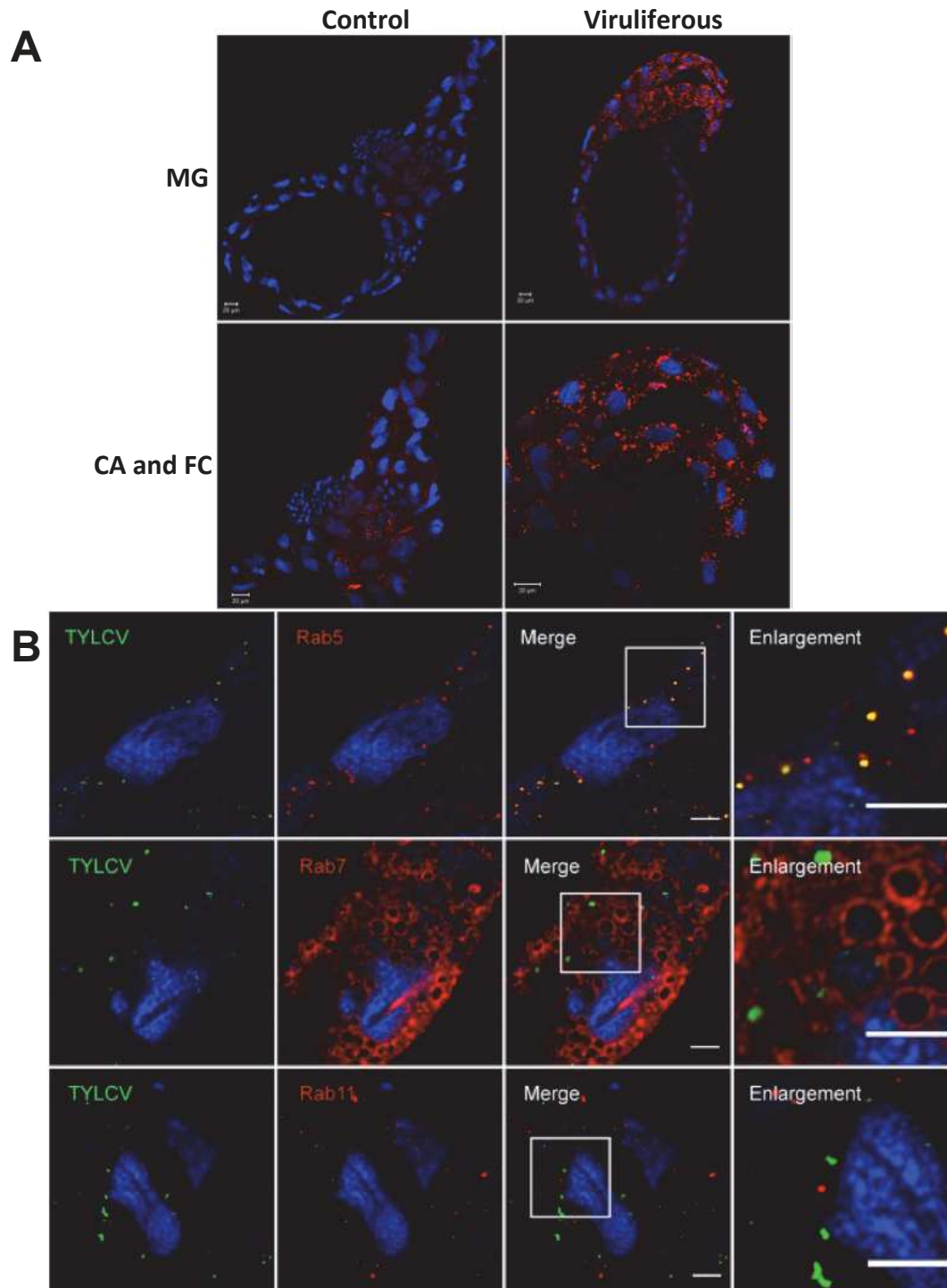


Figure 7. Localisation d'un géminivirus (*Tomato yellow leaf curl virus* - TYLCV) dans le système digestif de son vecteur *Bemisia tabaci*.

A. Visualisation du *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) dans les intestins moyens, la chambre filtrante et le caecum de *B. tabaci*. MG, Midgut ; CA, Caecum ; FC, Chambre filtrante. Le TYLCV est visualisé en rouge à l'aide d'un anticorps primaire dirigé contre la capsid du virus (**Pan et al. 2017**). B. Co-marquage du TYLCV et des endosomes. Après acquisition sur des plants de tomates infectés par le TYLCV, les intestins moyens des mouches blanches ont été disséqués et préparés pour la réalisation de l'immunomarquage. Des anticorps primaires dirigés contre les endosomes précoces (anti-Rab 5), tardifs (anti-Rab 7) et de recyclage (anti-Rab 11) ont été utilisés (visualisation en rouge) en parallèle avec un anticorps dirigé contre les protéines de capsid du TYLCV (visualisation en vert) (**Xia et al. 2018**). Les noyaux sont colorés en bleu à l'aide du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). La barre blanche correspond à 5 µm.

De manière remarquable, il est possible d'associer un groupe taxonomique de vecteurs à chaque genre de geminivirus : les begomovirus sont transmis par aleurodes, les mastrevirus, curtovirus, becurtovirus et turncurtovirus par cicadelles, les topocuvirus et grablovirus par membracides et enfin les capulavirus par pucerons (**Czosnek et al. 2017**). Malgré la grande diversité des vecteurs impliqués, les géminivirus sont généralement considérés comme transmis selon le mode circulant non multipliant. Les études sur le passage des barrières rencontrées par les virions chez leurs vecteurs sont moins avancées que celles réalisées sur les luteovirus. Cependant, les données obtenues chez les begomovirus (transmis par l'aleurode *Bemisia tabaci*) et les capulavirus (transmis par le puceron *Aphis craccivora*) indiquent que la transmission repose sur des mécanismes communs très spécifiques. Tout d'abord, le virus pénètre dans l'insecte au niveau de l'intestin moyen antérieur (anterior midgut en anglais – AMG) (**Mercer, Schelhaas, et Helenius 2010; Ryckebusch et al. 2020**) ou de la chambre filtrante (**Figure 7A**)(**Ghanim, Brumin, et Popovski 2009; Mercer et al. 2010**) et se retrouve finalement localisé dans les glandes salivaires principales (principal salivary glands en anglais – PSG) (**Figure 8**) (**Ghanim et al. 2009; Ryckebusch et al. 2020**). A ce jour, toutes les espèces de la famille *Geminiviridae* connues utilisent la stratégie capsidale (**Czosnek, Ghanim, et Ghanim 2002; Ohnishi et al. 2009; Czosnek et al. 2017**). Cependant, aucun récepteur intestinal n'a encore été définitivement mis en évidence pour ces virus. Une étude récente a établi que les mécanismes d'entrée et accumulation du TYLCV dans l'intestin de son vecteur semblent similaires à ceux existant chez les luteovirus (**Figure 5C - (Xia et al. 2018)**) : Le TYLCV pénètre dans les cellules intestinales en utilisant des vésicules recouvertes de clathrine (**Pan et al. 2017**) et se localise ensuite dans les endosomes précoces (**Figure 7B - (Xia et al. 2018)**). Le virus est ensuite transporté vers la membrane basale suivant un processus inconnu. Une différence notable avec les luteovirus est l'absence de localisation du TYLCV dans les lysosomes, même si des mécanismes d'élimination du virus dans cette voie de dégradation ne sont pas à exclure.

Plusieurs protéines de l'insecte pourraient interagir avec les particules virales internalisées. En effet, de nombreuses protéines du vecteur ont été colocalisées avec des virus de la famille de *Geminiviridae*, En particulier du genre *Begomovirus* : la heat shock protein 70 (HSP70), la midgut protein (MGP), la cyclophilin B (CypB), la peptidoglycan recognition protein (PGRP) et la collagen protein. L'interaction entre la CP et le HSP70 peut entraîner l'élimination du virus par l'activation du système immunitaire du vecteur (**Götz et al. 2012**). Par Contre, l'interaction de la CP avec trois autres protéines favoriserait la transmission du virus: la MGP (**Rana et al. 2016**), la CypB (**Kanakala et Ghanim 2016**) et la Collagen protein (**Rana et al. 2019**). L'implication de la PGRP reste à ce jour inconnue (**Wang et al. 2016**).

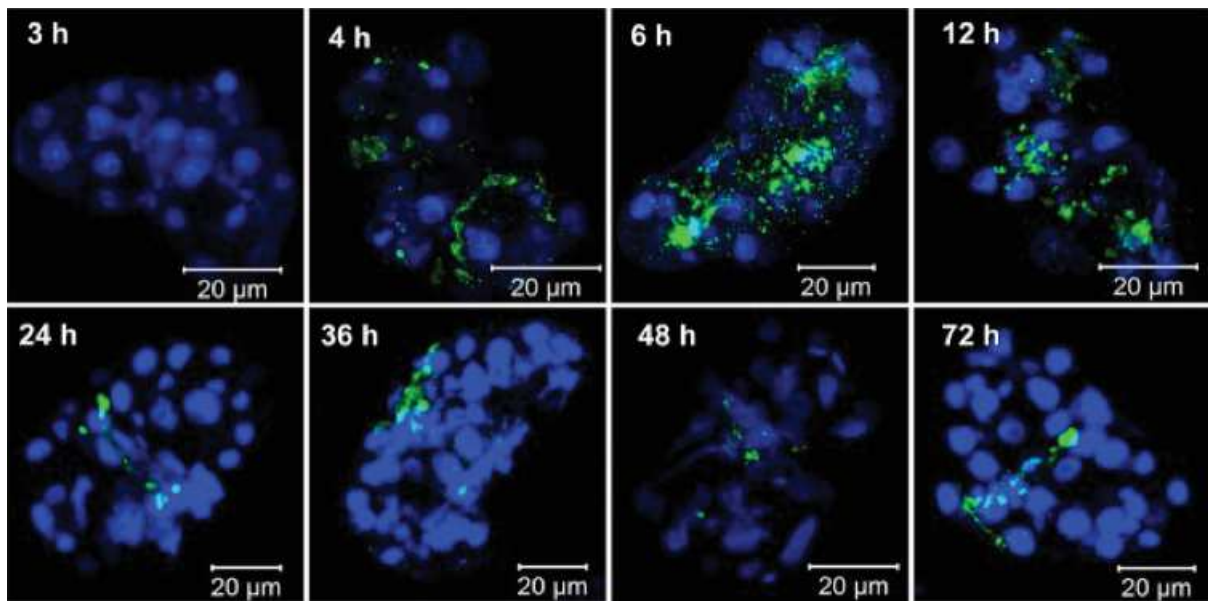


Figure 8. Visualisation au microscope confocal de l'entrée et de l'accumulation du TYLCV dans les glandes salivaires principales de *B. tabaci*.

Les mouches blanches ont acquis le virus durant un temps maximum de 72 heures sur des plantes infectées. À chaque temps indiqué sur les images, des mouches blanches ont été prélevées et disséquées pour récupérer les PSG. Le virus est visualisé en vert à l'aide d'anticorps dirigés contre la CP. Les noyaux sont visualisés en bleu à l'aide du DAPI. (Wei *et al.* 2014)

Un possible rôle d'autres protéines des aleurodes a également pu être mise en évidence par l'utilisation de systèmes in vitro tels que le double hybride en levure ou le pull-down ; il s'agit de la heat shock protein 16 (HSP16), de la thioredoxin-like protein, la protéine GroEL et de la vesicle associated membrane protein-associated protein B (VAPB). Pour les deux premières citées aucune information n'est disponible (**Ohnesorge et Bejarano 2009; Saurav et al. 2019**).

L'homologue de la protéine GroEL, comme pour les luteovirus, semble interagir avec certaines espèces de géminivirus (**Gottlieb et al. 2010; Xu, Barro, et Liu 2010; Rana et al. 2012**). Cependant, en l'absence de confirmation, la controverse chez les couples puceron/luteovirus (**Bouvaine, Boonham, et Douglas 2011**), jette aussi un doute sur la réalité du rôle de cette protéine dans la transmission des géminivirus par les mouches blanches. Enfin, la VAPB est surexprimée en présence du virus. Lorsqu'elle est « silencée », la quantité de virus dans l'hémolymphe et les glandes salivaires augmente (**Zhao et al. 2019**). En bref, l'implication et le mode d'action de l'ensemble de ces protéines dans la transmission des virus de la famille des *Geminiviridae* restent incertains (**Wang et Blanc 2021**).

Les géminivirus se retrouvent dans les PSG de leurs vecteurs (**Wei et al. 2014; Ryckebusch et al. 2020**). Dans le cas du TYLCV, les virions se retrouvent dans toutes les cellules des PSG à des temps précoces d'acquisition. Au fur et à mesure que le temps d'acquisition augmente, les particules virales se concentrent plus spécifiquement dans la partie centrale de cet organe, qui comprend les cellules entourant le lumen du canal salivaire (**Figure 8 - (Wei et al. 2014)**).

Si l'absence de réplication dans le vecteur semble très généralement acceptée pour l'immense majorité des espèces de la famille *Geminiviridae*, la question a longtemps été (et est encore) débattue pour quelques begomovirus (**Czosnek et Ghanim 2012; Czosnek et al. 2017**). En 2009, dans une expérience princeps, **Ohnishi et al. (2009)** ont acquis le TYLCV par deux espèces d'aleurode, l'une vectrice et l'autre non. Après 14 jours d'acquisition, les insectes sont placés sur une plante non-hôte du virus. Six jours après le transfert sur cette plante non hôte, la quantité de TYLCV a augmenté de 5 fois dans l'espèce vectrice alors qu'elle est restée constante dans la non-vectrice. **Pakkianathan et al. (2015)** ont par la suite apporté des preuves de l'éventuelle réplication du TYLCV dans les PSG de son vecteur. Suite à une acquisition du virus durant 8 heures, les auteurs ont déplacé les aleurodes sur des plantes saines et non-hôtes du virus tout en y quantifiant le virus. Lors des trois premiers jours sur plantes saines, ils ont observé que les quantités d'ADN et de transcrits viraux augmentaient.

Parallèlement, les auteurs ont détecté, par la technique d'hybridation in situ en fluorescence, la présence de brins d'ADN complémentaires dans les noyaux des cellules épithéliales de l'aleurode. Par la suite, **Wang et al. (2016)** ont confirmé que le nombre de transcrits viraux, de molécules d'ADN, mais également de protéines de capsid augmentait bien dans les premières 48 heures après l'acquisition du virus.

Paradoxalement, d'autres publications dont deux plus récentes semblent réfuter l'idée d'une réplication du TYLCV ou du TYLCV-Mild dans la mouche blanche. Dans la première, **Becker et al. (2015)** font l'hypothèse que le vecteur acquière des brins viraux complémentaires et des facteurs de réplication de la plante en même temps que les particules virales. Cela permettrait au virus une réplication dans une plante non-hôte de ce virus grâce à ces facteurs viraux et à ceux de la plante hôte. Pour étayer cette hypothèse, **Sánchez-Campos et al. (2016)** ont réalisé les mêmes manipulations, mais en associant un traitement à la DNase I pour éliminer les ADN qui ne sont pas encapsidés. Malgré ce traitement, des ADN (brin génomiques et complémentaire) et des ARN viraux ont été trouvés associés aux particules dans les aleurodes.

Finalement, le débat pourrait être tranché suite à une étude très récente qui met en évidence une réplication du TYLCV dans les glandes salivaires de son vecteur (**He et al. 2020**). Les auteurs montrent que la présence du TYLCV dans les PSG de *B. tabaci* induit la mise en place d'un environnement favorable à la réplication par activation de la machinerie de synthèse de l'ADN et de l'ADN polymérase δ en particulier. De plus, la protéine Rep du TYLCV qui permet d'initier la réplication virale est capable d'interagir in vitro (pull-down GST) avec une protéine, la PCNA (proliferating cell nuclear antigen), permettant le recrutement de l'ADN polymérase δ nécessaire à la réplication du virus (**He et al. 2020**).

L'ensemble de ces travaux (**Ohnishi et al. 2009; Becker et al. 2015; Pakkianathan et al. 2015; Sánchez-Campos et al. 2016; He et al. 2020**) pose la question d'une possible réplication dans le vecteur pour l'ensemble des virus transmis selon le mode circulant non multipliant. La probable réplication de quelques espèces de la famille *Geminiviridae* dans leurs vecteurs amène à rechercher s'il est possible qu'une réplication s'opère mais ne soit pas encore détectée pour d'autres virus des familles *Luteoviridae* et *Nanoviridae*. Cette réplication pourrait ce faire dans : (i) de faible quantité, (ii) des temps très courts suivant l'acquisition, (iii) un organe spécifique ou (iv) une association de plusieurs de ces possibilités, ce qui rendrait sa détection difficile malgré les technologies actuelles.

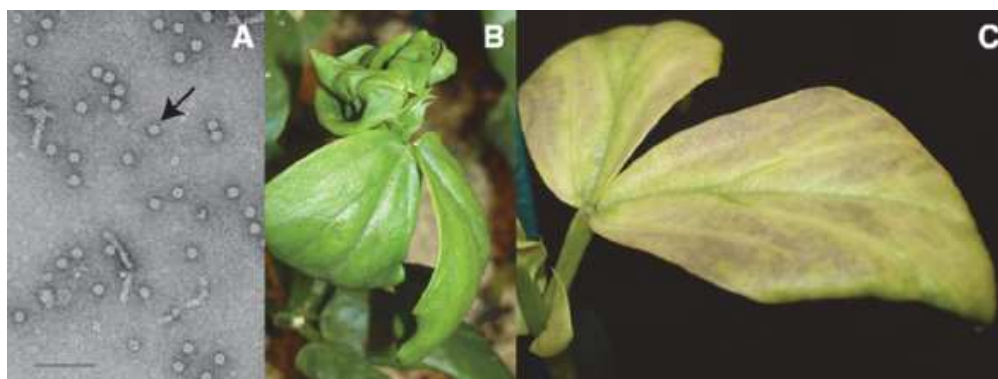
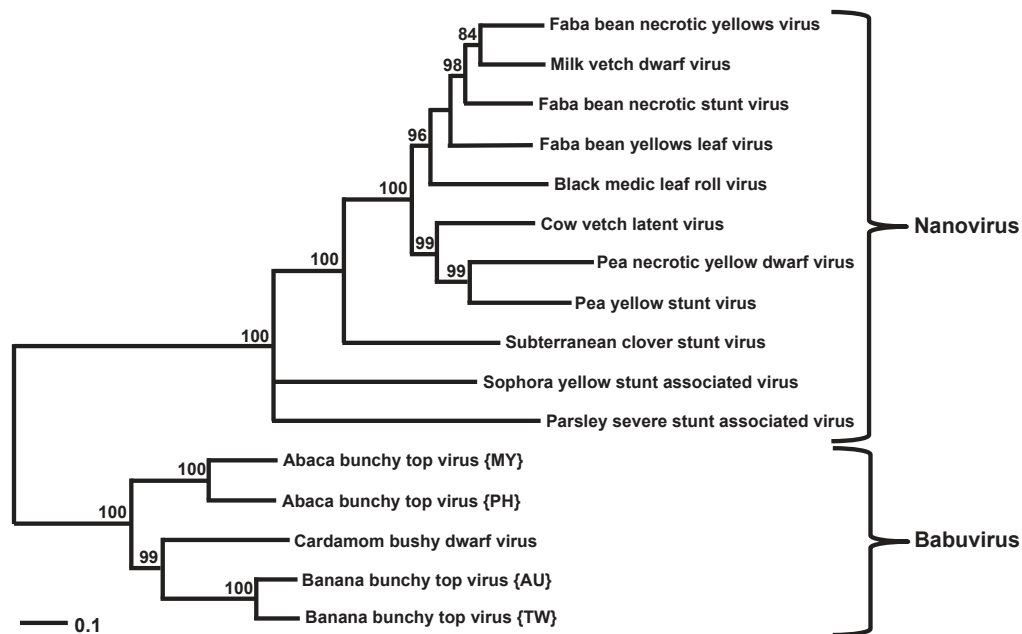


Figure 9. Arbre phylogénétique, visualisation des particules virales et observation des symptômes causés par les virus appartenant à la famille des *Nanoviridae*.

Arbre phylogénétique des *Nanoviridae* réalisé à partir de l'alignement des séquences des segments communs aux deux genres viraux (segments C, M, N, R et S), *Babuvirus* et *Nanovirus* (Gronenborn et Vetten 2020). A. Micrographie électronique d'une purification partielle de *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV) multiplié sur fèves (*V. faba* cv. Shambat). La flèche montre une particule du FBNSV mesurant environ 20 nm de diamètre (Grigoras et al. 2009). B, C. Symptômes sur une fève infectée par du FBNSV depuis 2-3 semaines montrant un enroulement des folioles sur elles-mêmes (B) et des chloroses et des nécroses (C). Les plantes ont été infectées suite à l'inoculation du virus par le vecteur *Aphis craccivora* (Grigoras et al. 2009).

ii. Famille *Nanoviridae*

Le virus modèle étudié tout au long de ma thèse fait partie de la famille des *Nanoviridae*. Dans la suite de ce manuscrit, je vais décrire ce qui est actuellement connu sur cette famille virale, en relation avec la transmission virale, ainsi que les travaux que j'ai menés. La famille *Nanoviridae* se subdivise en deux genres: *Babuvirus* et *Nanovirus*. Il existe de plus une espèce qui n'a pas encore pu être assignée à un genre particulier: *Coconut foliar decay virus* (**Figure 9 - (Gronenborn et Vetten 2020; ICTV 2019)**). Trois espèces font actuellement partie du genre *Babuvirus*: *Abaca bunchy top virus* (ABTV), *Banana bunchy top virus* (BBTV) et *Cardamom bushy dwarf virus* (CBDV). Toutes infectent des plantes de la famille des *Musaceae*. Le genre *Nanovirus* comprend à l'heure actuelle 9 espèces: *Black medic leaf roll virus* (BMLRV), *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV), *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV), *Faba bean yellow leaf virus* (FBYLV), *Milk vetch dwarf virus* (MVDV), *Pea necrotic yellow dwarf virus* (PNYDV), *Pea yellow stunt virus* (PYSV) et *Subterranean clover stunt virus* (SCSV). Durant de nombreuses années, les nanovirus ont été isolés uniquement à partir de plantes de la famille des *Fabaceae* et des *Amaranthaceae* (**Franz, Makkouk, et Vetten 1997**). Récemment, l'espèce *Parsley severe stunt associated virus* (PSSaV) a été trouvée chez les *Apiaceae*, (**Vetten et al. 2019**). Chez tous ces hôtes, les nanovirus sont restreints au phloème où ils se multiplient dans les cellules compagnes (**Shirasawa-Seo et al. 2005**). Les symptômes caractéristiques d'une plante infectée par un nanovirus sont (i) le nanisme et (ii) l'enroulement des folioles (**Figure 9B**). Dans des temps plus tardifs d'infection, on observe (iii) des chloroses et (iv) des nécroses qui entraînent finalement la mort de la plante (**Figure 9C - Ukatul et al. 1993; Grigoras et al. 2009**).

Les nanovirus sont des virus dont le génome est composé de 6 (genre *Babuvirus*) à 8 (genre *Nanovirus*) segments d'ADN simple brin circulaire (**Figure 10A**), chacun encapsidé individuellement dans une particule virale. Il s'agit de ce fait, de virus multipartites (**Lucía-Sanz et Manrubia 2017a**). La capside icosaédrique non enveloppée de 17 à 20 nm de diamètre possède une symétrie T=1 et résulte de l'assemblage de 60 capsomères (**Figure 9A - Grigoras et al. 2009; Gronenborn et Vetten 2020**). Tous les segments génomiques ont une taille d'environ 1 kilobase (923 à 1111 bases)(**Gronenborn et Vetten 2020**). Les segments C, M, N, R et S sont communs aux deux genres de *Nanoviridae*. Les babuvirus possèdent en outre un segment qui leur est propre, U3, et les nanovirus trois, U1, U2 et U4. Chaque segment code pour une seule protéine. C code pour Clink, une protéine qui induit le passage de la cellule dans une phase de son cycle favorable la synthèse d'ADN (**Aronson et al. 2000**). M code pour la protéine de mouvement (MP) nécessaire au virus pour se déplacer dans la plante (**Wanitchakorn et al. 2000**). N code pour la protéine NSP essentielle à la transmission (**Franz et al. 1999; Grigoras et al. 2018**).

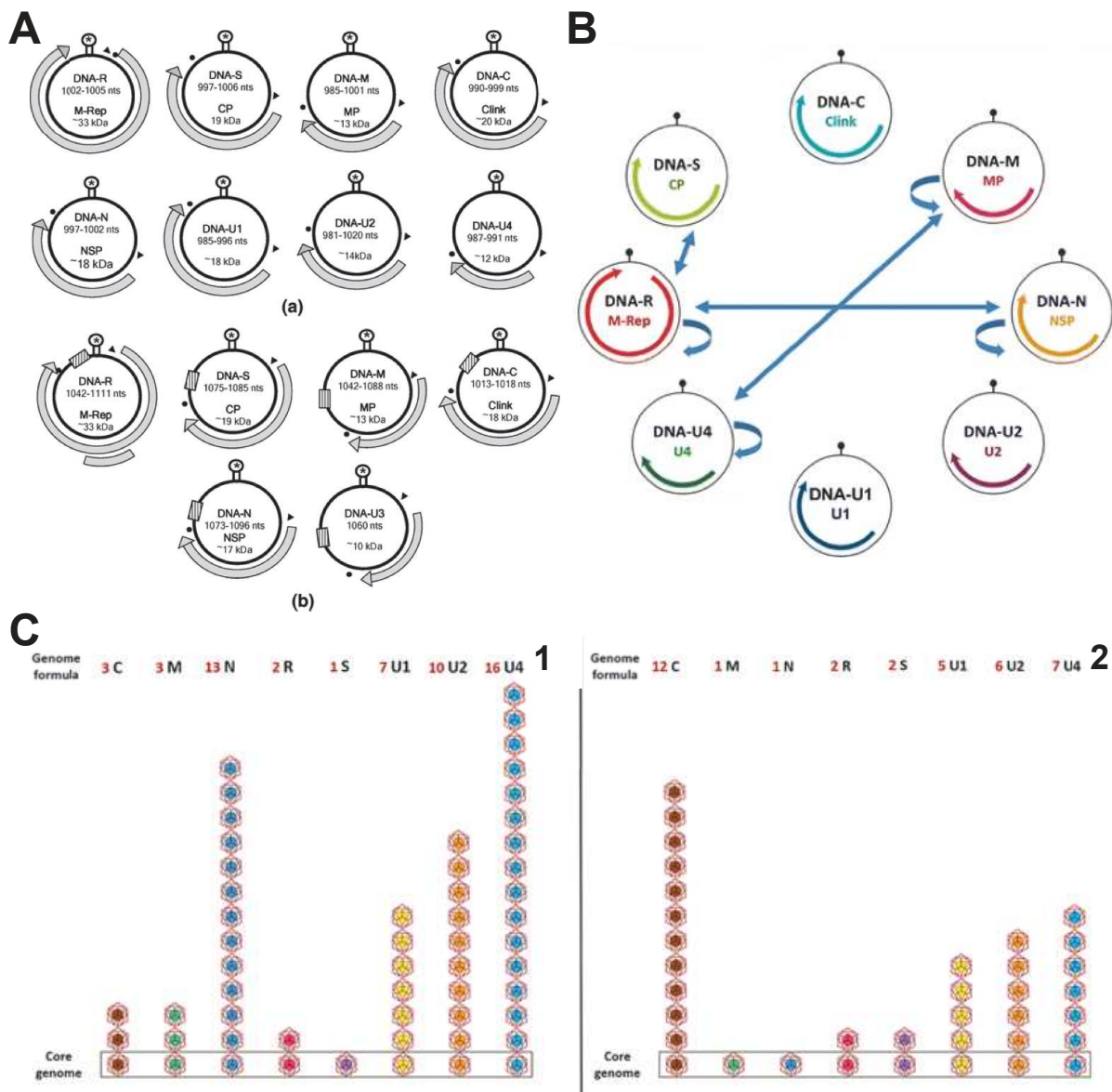


Figure 10. Organisation génomique et interaction entre les protéines des virus de la famille des *Nanoviridae*.

A. Organisation génomique des virus des genres (a) *Babu-* et (b) *Nanovirus* (famille *Nanoviridae*). Dans chaque cercle est noté, de haut en bas, le nom et la taille du segment ainsi que le nom et le poids moléculaire de la protéine codée. M-rep, master rep ; CP, coat protein ; MP, movement protein ; Clink, cell-cycle linking protein ; NSP, nuclear shuttle protein et U1-4, unknown proteins. Les flèches correspondent aux ORFs. La case hachurée chez les babuvirus correspond à une région commune. Le triangle représente la TATA box et le point indique le signal de polyadénylation (Mandal 2010). B. Schématisation des interactions observées entre les différentes protéines du PNYDV à l'aide de la technique de complémentation bi-moléculaire en fluorescence (BiFC) (Krenz et al. 2017). C. Représentation graphique des formules génomiques du FBNSV chez 1. *Vicia faba* et 2. *Medicago truncatula*. La quantité de chaque segment viral présent dans la plante hôte est estimée par qPCR et est ensuite exprimée relativement à l'ADN viral total. La quantité du segment le plus rare est arbitrairement fixée à 1 et la quantité des autres segments est exprimée relativement au segment le plus rare. Le nombre de particules présentes dans chaque colonne (correspondant au segment dont le nom est indiqué en haut) indique le nombre relatif de copies de chaque segment, donc de chaque gène viral. La formule génomique est indiquée au-dessus des graphiques adapté de (Sicard et al. 2016)

R code pour la protéine M-rep qui initie la réplication (**Horser, Harding, et Dale 2001; Timchenko et al. 1999, 2000**). De plus, la M-Rep possède une activité ATPase essentielle pour la réplication de l'ADN viral. Il s'agit du seul exemple d'activité enzymatique associée à la protéine d'initiation de la réplication pour un virus à ADN simple brin (**Vega-Arreguín et al. 2005**). S code pour la capsid (CP) (**Chu et al. 1993; Katul et al. 1997; Wanitchakorn, Harding, et Dale 1997**). Enfin, les segments U1, U2 et U4 pour les nanovirus ou U3 pour les babuvirus n'ont pas encore de fonction connue (**Sicard et al. 2016**).

Grigoras et al. (2018) ont récemment étudié le comportement du FBNSV (*Nanovirus*) lors de l'infection des plantes et de la transmission par pucerons lorsqu'un des 8 segments est absent. Cette étude a notamment permis de démontrer que les segments M, R et S sont essentiels pour l'infection de la plante. De plus ces auteurs ont observé que l'absence d'un des segments C, N, U1, U2 ou U4 ne compromet pas totalement l'infection systémique de la plante. Cependant, l'absence des segments U1 et/ou U2 influence la sévérité des symptômes et l'accumulation virale dans la plante. L'absence du segment N, comme indiqué précédemment, n'affecte en rien le développement de l'infection de la plante mais entraîne une perte totale de la transmission du virus par puceron, démontrant qu'il s'agit bien du segment codant pour le facteur assistant à la transmission décrit par (**Franz et al. 1999**). Le segment U4 reste une énigme dans la mesure où son absence n'entraîne aucun effet visible, ni sur l'infection de la plante, ni sur la transmission, dans les conditions de laboratoire. A ce jour, aucun clone infectieux n'existe pour les virus du genre Babuvirus et aucune étude similaire sur la nécessité de chaque segment n'a pu être effectuée.

Pour approfondir la compréhension du mode de fonctionnement des nanovirus, **Krenz et al. (2017)** ont analysé les interactions entre les différentes protéines du PNYDV en utilisant la technique de complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC - **Figure 10B**). Ils ont mis en évidence des interactions entre MP et U4, NSP et M-Rep, CP et M-Rep mais également la possibilité pour NSP, M-Rep, MP et U4 d'interagir avec elles-mêmes. Aucune interaction entre CP et NSP n'a été mise en évidence avec cette technique. Cependant, deux études réalisées sur le BBTV laissent penser que cette interaction serait possible (**Ji et al. 2019; Yu et al. 2019**).

Le nanovirus *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV) est le modèle utilisé dans mon laboratoire d'accueil. Les études antérieures à ma thèse ont visé à comprendre comment les nanovirus se comportent dans sa plante hôte et lors de sa transmission. Il a en particulier été montré que les segments du FBNSV ne s'accumulaient pas à fréquence égale dans la plante hôte. Les fréquences relatives des segments étant très reproductibles dans une espèce de plante hôte donnée, elles définissent ce que **Sicard et al. (2013)** ont appelé une « formule génomique » dont le concept est explicité dans la **Figure 10C**.

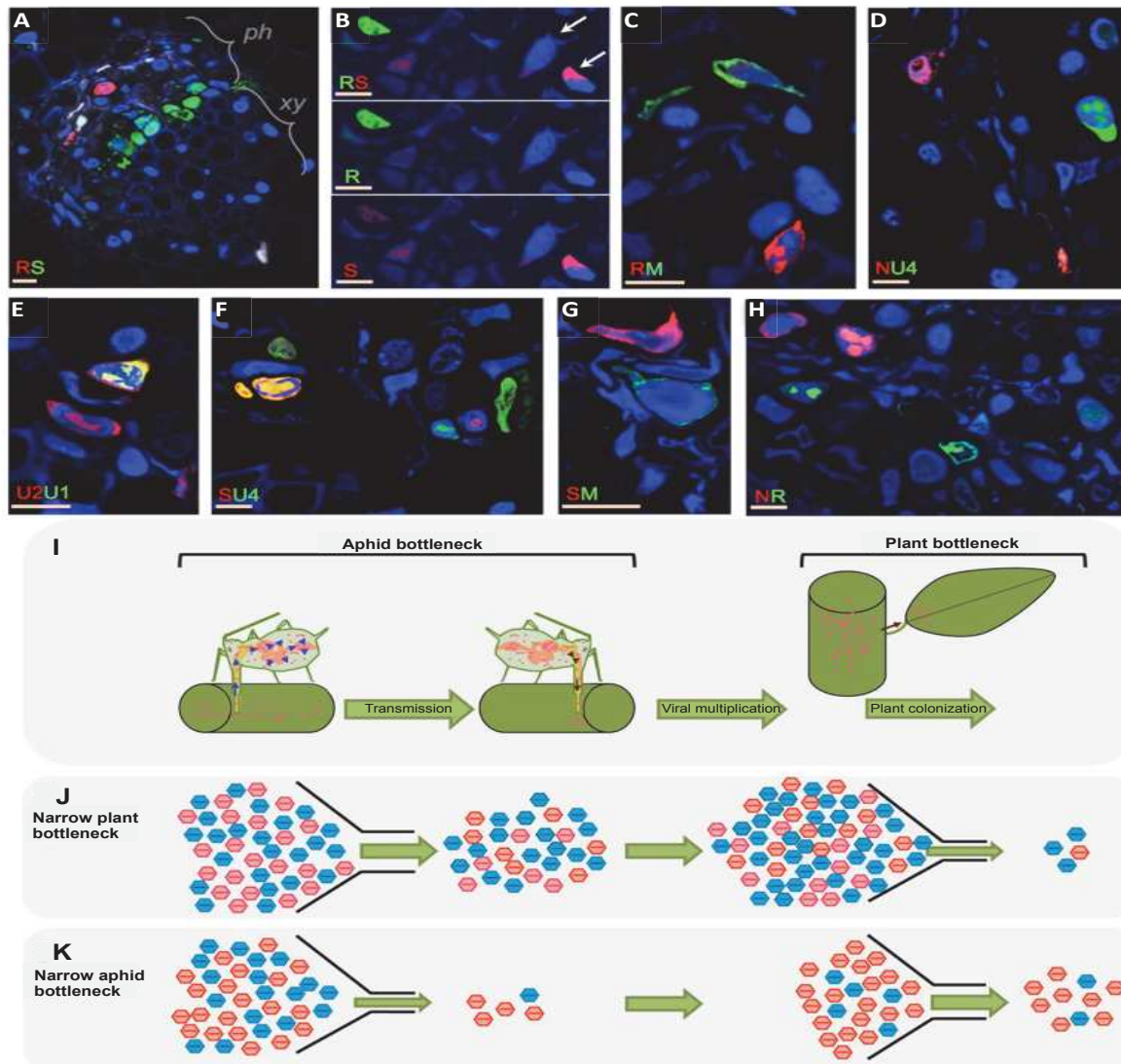


Figure 11. Localisation et transmission d'un virus multipartite.

A-H. Coupes transversales de pétioles de fèves infectées par le FBNSV. Ph correspond au phloème, seul tissu infecté par les nanovirus ; xy correspond aux faisceaux du xylème (indiqués sur l'image A). Par la technique d'hybridation in situ en fluorescence, les segments sont marqués par paires avec des sondes ADN segment-spécifique soit rouges soit vertes. Sur les images A et B, les fluorochromes incorporés dans les sondes à ADN sont inversés pour les segments R et S. Dans toutes les images, les canaux rouge et vert sont fusionnés sauf pour les images en B où les canaux sont fusionnés dans l'image du haut et découplés dans les deux images en-dessous pour mettre en évidence une accumulation du segment S dans les cellules où le segment R n'est pas détecté (flèches blanches). Les noyaux sont colorés en bleu par le DAPI. Les barres blanches horizontales représentent 10 microns (**Sicard et al. 2019**). I-K. Illustration des goulots d'étranglement potentiels rencontrés par le FBNSV au cours de son cycle de vie. I. Les goulots d'étranglement peuvent avoir lieu au niveau de la transmission (aphid bottleneck) ou lors de la colonisation de la plante (Plant bottleneck). J. Effet d'un goulot d'étranglement plus étroit pendant la colonisation de la plante que pendant la transmission. K. Effet d'un goulot d'étranglement plus étroit pendant la transmission que pendant la colonisation de la plante. Les capsides bleues et rouges contiennent deux allèles du même segment du FBNSV (**Gallet et al. 2018**).

Les formules génomiques du FBNSV observées chez *Vicia faba* et *Medicago truncatula* sont respectivement $3^C 3^M 13^N 2^R 1^S 7^{U1} 10^{U2} 16^{U4}$ et $12^C 1^M 1^N 2^R 2^S 5^{U1} 6^{U2} 7^{U4}$ (Sicard et al. 2013). La formule génomique n'est en aucun cas dépendante des conditions initiales d'infection puisque les mêmes fréquences relatives d'équilibre sont atteintes lorsque les plantes sont inoculées avec différentes quantités relatives des segments. (Sicard et al. 2013). Mon équipe a ensuite voulu démontrer que si la formule génomique impacte la production des différents ARNm viraux, projet sur lequel j'ai travaillé durant mon stage de Master 2. (Annexe thèse – publication « in preparation »). Nous avons observé que les variations du nombre de copies de chaque segment corrèlent parfaitement avec les changements de l'expression du gène correspondant. En d'autres termes, les variations de la formule génomique entraîne une modification de l'expression des gènes. Ces résultats supportent l'idée que ce virus (et peut être les autres virus multipartites) ajuste immédiatement l'expression de ses gènes lors de changement d'environnement (par exemple lors du passage de la fève à la luzerne), en ajustant leur formule génomique. Nous avons parallèlement vérifié par séquençage haut-débit de lignées de FBNSV passées de fève à luzerne que la formule génomique varie sans apparition de mutation dans le génome, suggérant que ce phénomène résulte d'une plasticité de la formule génomique.

Mon équipe a également observé la localisation respective des différents segments du FBNSV dans la plante (Figure 11A à H - (Sicard et al. 2019)). Par la technique FISH, deux types d'images ont été obtenus lors du co-marquage de paires de segments du FBNSV à l'aide de sondes spécifiques ayant des fluorescences différentes : i) des cas minoritaires de co-localisations où la cellule contient les deux segment ciblés et ii) une majorité de cellules marquées par une seule sonde, donc ne contenant qu'un seul des deux segments ciblés. Des quantifications de fluorescence dans l'ensemble de ces cellules ont montré que l'accumulation d'un segment dans une cellule est totalement indépendante de l'accumulation des autres. Ces observations inattendues ont permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle un virus multipartite n'a pas besoin d'avoir la totalité de son génome présent dans une seule et même cellule pour être fonctionnel. Pour se multiplier dans leur plante-hôte, les différents segments produiraient dans les cellules dans lesquelles ils se trouvent des ARN et/ou des protéines qui seraient « mobiles » et diffuseraient ensuite vers les cellules voisines afin de compléter le système viral au niveau supra-cellulaire.

Les Nanovirus sont décrits comme uniquement transmis par puceron (Tableau 5 - (Hogenhout et al. 2008)).

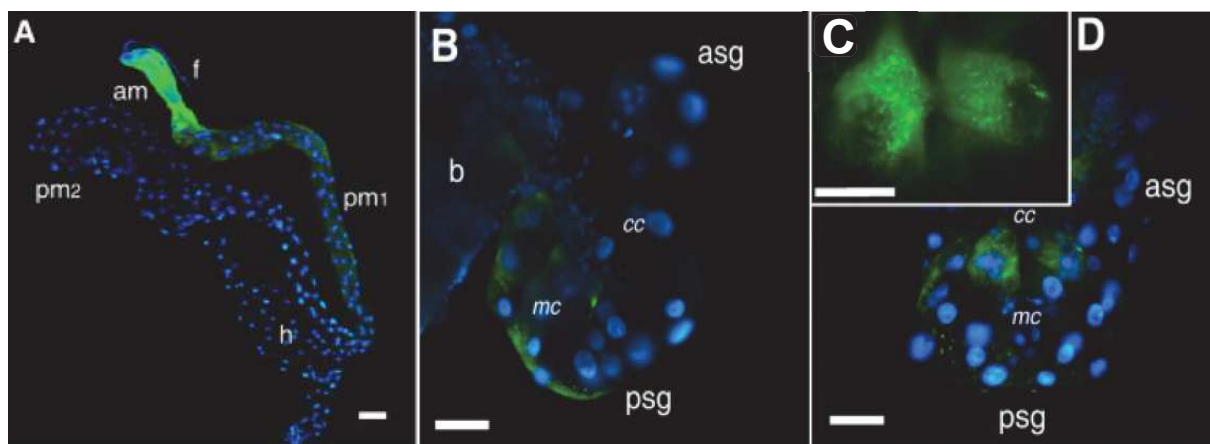


Figure 12. Localisation par immunofluorescence de la protéine de capsid du BBTV dans le système digestif et les glandes salivaires du vecteur *Pentalonia nigronervosa*.

A. Localisation de la capsid du BBTV dans le système digestif du vecteur. Am, anterior midgut; f, foregut ; h, hindgut ; pm₁, proximal part of the posterior midgut ; pm₂, distal part of the posterior midgut. Barre blanche = 100 µm. B to D. Localisation de la CP du BBTV dans les glandes salivaires du vecteur. asg, accessory salivary glands ; b, brain ; cc, cover cells ; mc, main cells ; psg, principal salivary glands. Barre blanche = 50 µm. (Bressan et Watanabe 2011)

Mon équipe a mis en évidence un changement de la fréquence relative des segments génomiques lors du passage de la plante au vecteur (**Sicard et al. 2015**). Ce phénomène est inattendu pour un virus transmis selon le mode circulant non multipliant, puisqu'il est difficile d'expliquer un changement de la fréquence relative des segments sans invoquer leur réplication. Cette étude a en outre permis de confirmer pour le FBNSV les observations faites auparavant (**Franz, Makkouk, et Vetten 1998**) sur le *Faba bean necrotic yellow virus* (FBNYV) et montrant que *Acyrtosiphon pisum* et *Aphis craccivora* sont tous deux de bons vecteurs. Il a également été établi que *Myzus persicae* est compétent pour la vection du FBNSV (**Sicard et al. 2015**). Enfin, dans une autre étude, mon équipe a déterminé que seul un faible nombre de particules virales fondent la nouvelle population dans une plante infectée suite à la transmission par un puceron : environ 40. Il existe donc un fort goulot d'étranglement pour les nanovirus lors de la vection, ce qui augmente le risque de perte d'un segment durant la transmission, en particulier les segments rares, et donc accroît le coût du multipartitisme (**Figure 11 I à K - (Gallet et al. 2018)**).

Les études réalisées sur les interactions moléculaires et cellulaires entre les nanovirus et leurs vecteurs ont été réalisées dans un premier temps sur le FBNYV dans les années 1990. Elles ont notamment permis de mettre en évidence que le FBNYV, au delà des particules virales, avait besoin d'un facteur supplémentaire présent dans les plantes infectées pour que la transmission soit possible (**Franz et al. 1999**). Les auteurs ont d'abord constaté que le virus purifié n'était pas transmissible. Pour compléter la transmission, les pucerons devaient être nourris au préalable sur des plantes infectées par une souche transmissible du FBNYV. Ce n'est qu'à cette condition que les pucerons devenaient capables d'acquérir sur membrane les particules purifiées. Ces observations supposaient l'existence d'un facteur assistant de la transmission qui serait une protéine non structurale produite dans les plantes infectées (**Franz et al. 1999**). Très récemment, le segment N a été identifié comme codant pour ce facteur (**Grigoras et al. 2018**). Le chapitre 5 de ma thèse détaille l'historique et les connaissances sur les facteurs assistants de la transmission, et notamment les particularités de celui des nanovirus, la protéine NSP.

Avant 2017, toutes les autres études réalisées sur l'interaction entre un nanovirus et l'un de ses insectes vecteurs concernaient le couple BBTV-*Pentalonia nigronervosa* (**Bressan et Watanabe 2011; Watanabe, Borthakur, et Bressan 2013, 2016; Watanabe et Bressan 2013; Watanabe, Greenwell, et Bressan 2013; Jebakumar, Balasubramanian, et Selvarajan 2018**). Le BBTV, tout comme les geminivirus, a la capacité de transiter par l'AMG et les PSG (**Figure 12 - (Bressan et Watanabe 2011)**).

L'AMG est l'organe dans lequel l'accumulation du virus est la plus importante et représente ainsi un stock de virus mobilisable durant toute la vie du vecteur pour la transmission. Toutefois, une légère diminution de la quantité de virus commence à apparaître 7 jours après la fin de l'acquisition du virus par l'insecte (**Watanabe et Bressan 2013; Watanabe, Greenwell, et al. 2013**). Récemment, une étude a montré une corrélation positive entre la charge virale du BBTV chez le puceron et le pourcentage de plantes infectées. Il existe donc un lien direct entre la quantité de virus dans le vecteur et l'efficacité de la transmission (**Jebakumar, Balasubramanian, et Selvarajan 2018**). Les travaux sur le BBTV n'ont pas permis d'éclairer les modalités de circulation intracellulaire de ce virus au niveau de l'AMG (**Watanabe et al. 2016**). Les auteurs n'ont pas pu montrer une association du virus avec un compartiment subcellulaire particulier, et ceci malgré des tentatives de colocalisation avec les endosomes (précoces et tardifs), les lysosomes, les macropinosomes, les microtubules, l'actine et les radeaux lipidiques (**Figure 5C - (Watanabe et al. 2016)**). Il est fort probable que cet échec soit lié au manque de marqueurs spécifiques fiables dans ce système biologique (**Watanabe et al. 2016**) et des études similaires devront être poursuivies. Enfin, les recherches réalisées par immunocapture PCR, dot-blot et far-western blot ne démontrant aucune interaction entre le BBTV et la protéine GroEL de l'endosymbionte *Buchnera* a amené les mêmes auteurs à conclure que cette interaction est peu probable que ce soit in vitro ou in vivo. (**Watanabe, Borthakur et al. 2013**).

4. Objectifs de la thèse

Durant ma thèse, j'ai eu comme objectifs de: (i) Revisiter et définir le plus précisément possible le trajet d'un nanovirus dans son insecte vecteur en distinguant les différents segments génomiques (**Chapitre 1**). (ii) Comparer la transmission de deux virus souvent considérés comme transmis de manière similaire: un geminivirus (ALCV) et un nanovirus (FBNSV), notamment lors de leur transit à l'intérieur du même individu vecteur (**Chapitre 2**). (iii) Etudier l'acquisition par le vecteur de différents groupes incomplets de segments génomiques du FBNSV et la possibilité de reconstituer un génome viral complet (et dans ce processus de reconstitution, éclairer en particulier le rôle du facteur assistant de la transmission) (**Chapitre 3**). (iv) Identifier, par des techniques ex vivo et in vitro, des partenaires cellulaires des protéines virales que nous savons impliquées dans la transmission: NSP et CP (**Chapitre 4**).

L'une des finalités importantes de ma thèse a été d'éclaircir le rôle de la protéine NSP dans la transmission du FBNSV.

Nous avons voulu intégrer et mettre en perspective les résultats correspondants dans un contexte plus large, celui du mécanisme d'action des facteurs assistants de la transmission chez l'ensemble des virus de plantes. En effet, ces molécules existent dans des groupes viraux très divers qui suivent des modes de transmission différents. Pour autant, leur mode d'action a longtemps été considéré comme similaire. Les résultats de ma thèse questionnent cette homogénéité de mode d'action des « helpers ». Bien que beaucoup reste encore à faire, à nos yeux, ces résultats justifiaient la rédaction d'une revue sur ce domaine afin d'en avoir une vision synthétique et d'avancer de nouvelles hypothèses (**Chapitre 5**).

Travaux de thèse

**CHAPITRE 1 : DETERMINATION DU TRAJET
DU VIRUS DANS LE PUCERON ET ROLE DE
LA PROTEINE NSP DURANT CETTE ETAPE**

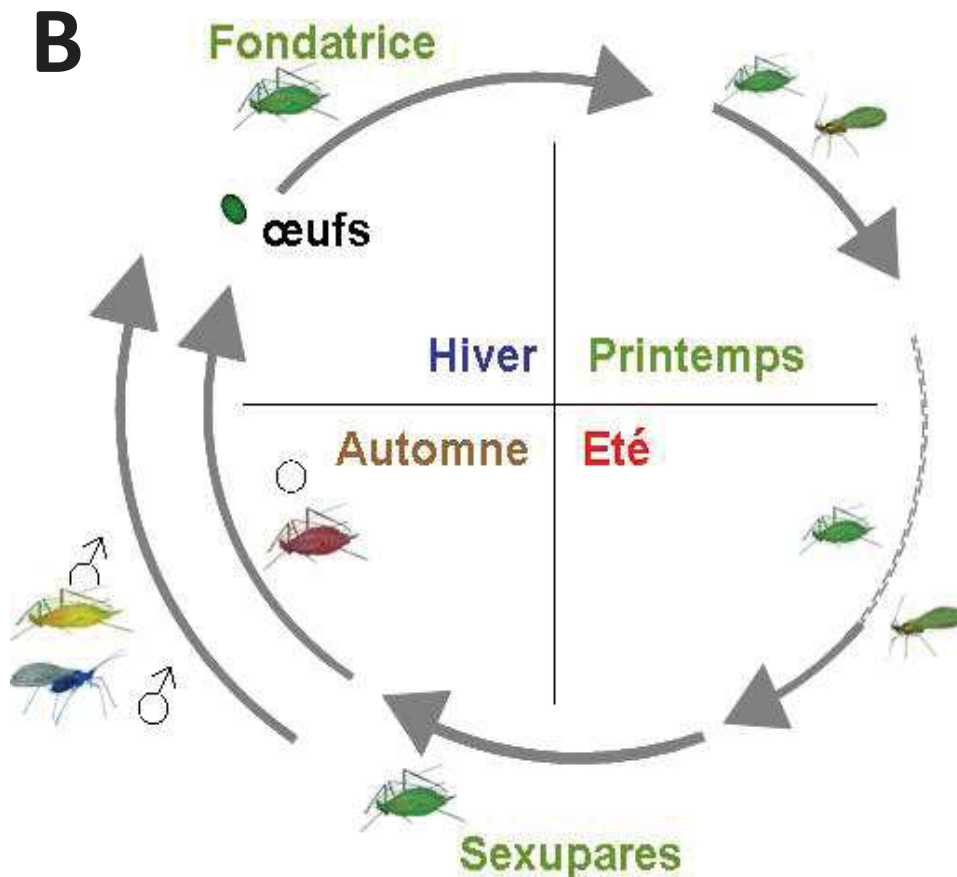
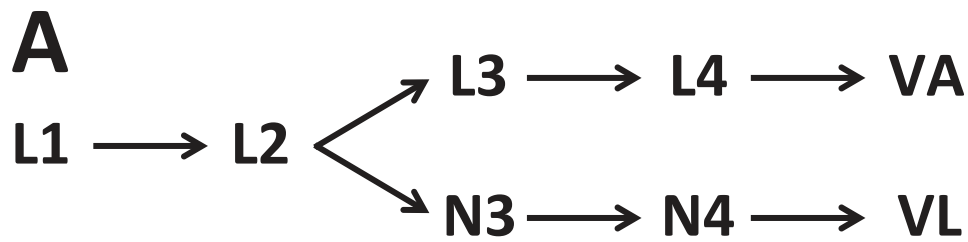


Figure 1. Cycle de vie d'un puceron.

A. Succession des stades de développement des pucerons du premier stade larvaire jusqu'à l'âge adulte. L1 à L4 : larves qui donneront des adultes aptères. N3 et N4: nymphes 3 et 4 (larves possédant des ébauches d'ailes sur le thorax). VA, adulte virginipare aptère. VL, adulte virginipare ailé. B. Schématisation du cycle biologique des pucerons au cours des saisons. Printemps : émergence des pucerons (femelles fondatrices) à partir des œufs. Les femelles se multiplient par parthénogénèse. Printemps et été : reproduction parthénogénétique des colonies. Automne : apparition de pucerons sexupares, dans les zones où les températures baissent, donnant naissance toujours par parthénogénèse, à des pucerons mâles ou femelles pouvant s'accoupler. Dans les zones tempérées, la multiplication reste parthénogénétique et dans les zones froides la multiplication alterne de parthénogénétique en saison chaude à sexuée avec ponte d'œufs en saison froide.

1. Généralité sur les pucerons

Avant de présenter l'ensemble de mes résultats, cette section décrit les pucerons vecteurs des nanovirus, qui sont l'un des matériels biologiques essentiels de ma thèse. La description s'appuie sur le site Encyclop'Aphid (<https://www6.inrae.fr/encyclopedie-pucerons>) créé et alimenté par des chercheurs de l'UMR IGEPP (institut de génétique, environnement et protection des plantes) du centre INRAE de Rennes et du réseau de biologie adaptative des pucerons et organismes associés (BAPOA).

Les pucerons peuvent se reproduire suivant deux modalités différentes : (i) la reproduction sexuée par l'intermédiaire de femelles ovipares, et (ii) la reproduction asexuée, également appelée parthénogénétique, grâce à des femelles vivipares ne pondant pas d'œuf mais donnant naissance à des larves génétiquement identiques. Les larves présentent 4 stades de développement (L1 à L4) se succédant sur une durée totale de 8 à 10 jours selon les conditions climatiques. Lors du passage au stade adulte, des pucerons non ailés (aussi appelé aptères) ou ailés peuvent émerger. La différenciation vers un adulte aptère ou ailé s'initie lors de la génération précédente. Cette différenciation est identifiable à partir du stade larvaire 3 et l'apparition d'ébauches alaires visibles sur le thorax. Le développement larvaire est donc commun jusqu'au stade L2 puis évolue soit vers des nymphes 3 et 4 avec ébauches alaires soit vers des larves qui en sont dépourvues (**Figure 1A**).

Le cycle biologique complet (holocycle) des pucerons est composé de reproduction parthénogénétique et sexuée alternant suivant les saisons. Au début du printemps, la femelle puceron sortie de l'œuf est nommée fondatrice. Par reproduction parthénogénétique, elle donne naissance à des larves aptères et/ou ailées appelées virginogènes (**Figure 1B**). Durant le printemps et l'été, la reproduction parthénogénétique se poursuit chez les nouvelles générations. La baisse des températures à l'automne entraîne l'apparition dans les colonies de femelles parthénogénétiques nommées sexupares. Ces femelles ont la caractéristique de donner naissance à des mâles et des femelles ovipares pouvant s'accoupler. Cette reproduction permet la production d'œufs assurant la survie de l'espèce durant l'hiver (**Figure 1B**). La plupart des espèces de pucerons réaliseront l'ensemble de l'holocycle sur une même espèce de plante (monoeciques), alors qu'environ 10 % des espèces (appelées dioeciques ou hétéroeciques) utilisent successivement des espèces de plantes différentes au cours de leur holocycle. Dans ce dernier cas, est définie une plante hôte primaire sur laquelle les pucerons présenteront une reproduction sexuée et une/des plantes hôtes secondaires sur lesquelles intervient la reproduction parthénogénétique durant les saisons chaudes.

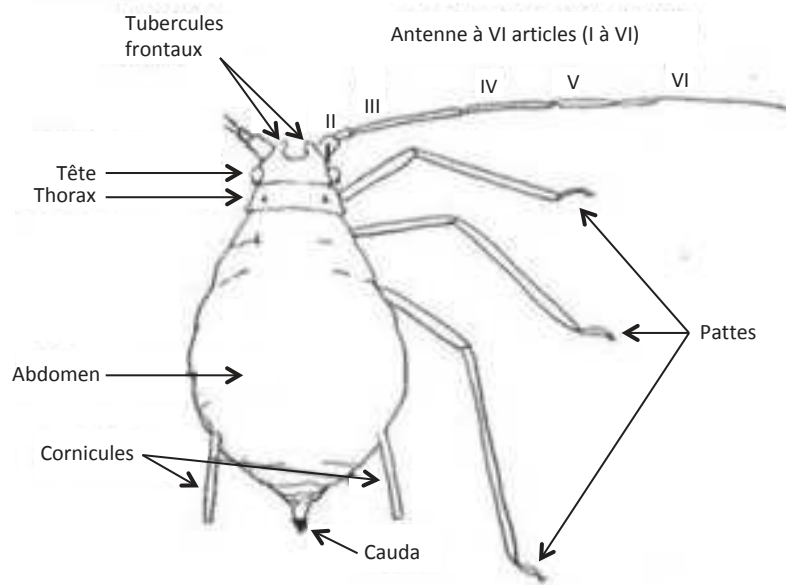


Figure 2. Description anatomique du corps d'un puceron.

Schéma de la morphologie d'un puceron. Visualisation des traits physiologiques que possèdent chaque puceron permettant leur identification.

De par la localisation de la plupart des pucerons dans des milieux tempérés, beaucoup de sous-familles ont perdu leur phase sexuée et réalisent seulement une reproduction parthénogénétique (anholocyclie).

Les pucerons sont des arthropodes qui possèdent un corps segmenté formé de trois parties distinctes : la tête, le thorax et l'abdomen (**Figure 2**). La tête des pucerons comporte une paire d'yeux composés (caractéristique commune à toutes les espèces), une paire d'antennes et un rostre possédant chacun des caractéristiques particulières essentielles pour l'identification des espèces. Les antennes sont situées sur la face supérieure de la tête. Elles sont variables en taille et formées de 3 à 6 articles. Elles possèdent des organes sensoriels de formes variées appelés *sensoria* ou *rhinaries* (**Figure 2**). Sur la face inférieure de la tête du puceron, le rostre, aussi appelé labium, protège les stylets. Le thorax comporte trois paires de pattes tandis que l'extrémité postérieure supérieure de l'abdomen est prolongé par une cauda et deux cornicules (**Figure 2**), également utilisé dans l'identification du fait de leur différence de forme, taille et couleur selon les espèces. Les pucerons se nourrissent positionnés sous les feuilles avec orientée la tête vers le bas. La cauda est un organe qui permet au puceron de diriger son miellat (fèces liquides, collantes et très sucrées rejetées par l'orifice anal) vers le bas sans qu'il coule sur son corps. Les cornicules sont des tubes par lesquels les pucerons peuvent sécréter un liquide contenant des phéromones d'alarme. Lors de stress environnementaux, le puceron sécrète ces phéromones pour prévenir l'ensemble de ces congénères. Les cornicules peuvent également servir au puceron à projeter de la cire pour se défendre contre d'éventuels prédateurs. L'ensemble du corps des pucerons est couvert d'un exosquelette rigide, la cuticule, constituée d'un enchevêtrement de chitine, protéines et lipides. Cet exosquelette délimite l'hémocoèle dans lequel baigne l'ensemble des organes des pucerons dont notamment le tube digestif, les glandes salivaires, et les organes génitaux ciblés dans les études sur l'interaction virus - vecteur.

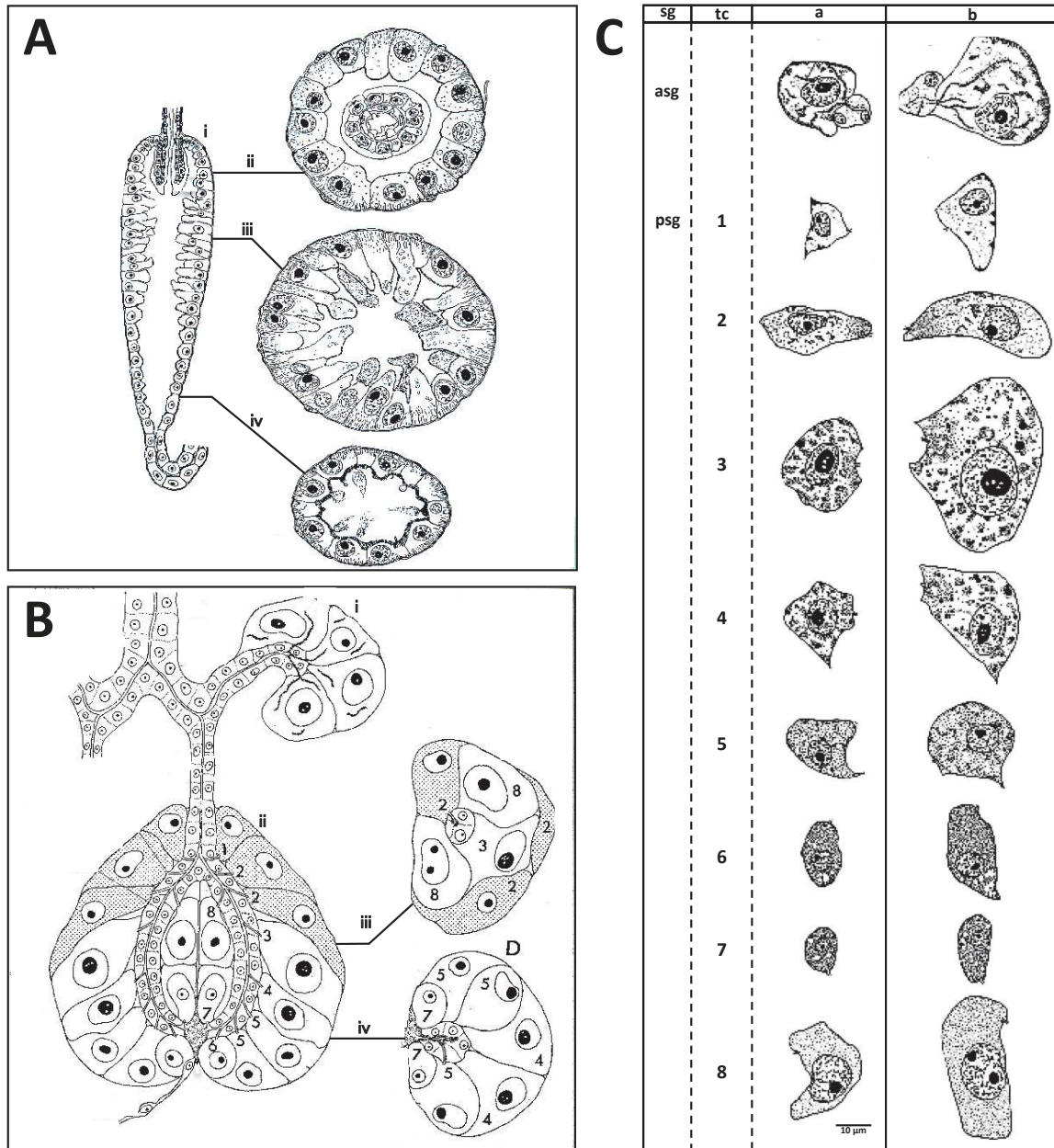


Figure 3. Description de l'intestin moyen antérieur et des glandes salivaires du puceron *Myzus persicae*.

A. Schématisation anatomique avec des coupes longitudinales (i) et transversales (ii)(iii)(iv) de L'AMG. B. Schématisation anatomique d'une glande salivaire accessoire (ASG - i) et principale (PSG - ii) ainsi que des coupes transversales d'un lobe de la glande salivaire principale (iii et iv). Les 8 types cellulaires distincts qui composent les glandes salivaires principales (numérotés 1 à 8) sont indiqués dans les schémas. C. Détails de coupes histologiques de chaque type cellulaire des ASG et PSG aux premier (a) et dernier (b) jours du stade larvaire. tc, type cellulaire. L'ensemble de ces figures est adapté des travaux de (Ponsen 1972).

Comme indiqué dans l'introduction de ma thèse, les virus du genre *Babuvirus* (*Nanoviridae*) ont été localisés dans l'AMG et les PSG de leur vecteur (**Bressan et Watanabe 2011; Watanabe et Bressan 2013; Watanabe et al. 2016**). Pour compléter la description de ces deux organes chez les pucerons, je me suis basé sur les travaux de (**Ponsen 1972**) (**Figure 3**).

2. L'intestin des pucerons

Selon Ponsen, le système digestif des pucerons peut être divisé en 4 parties : l'œsophage, l'intestin moyen, l'intestin postérieur et le rectum. L'ensemble du système digestif est formé d'une couche unicellulaire. Durant le développement larvaire et jusqu'à l'âge adulte, le système digestif des pucerons double de taille. Cependant, Ponsen observe que cet accroissement des dimensions du système digestif n'est pas dû à la présence d'un plus grand nombre de cellules qui reste à peu près constant du début à la fin de la vie du puceron. Il suppose qu'un simple accroissement de taille de chaque cellule permet l'augmentation en taille du système digestif. L'intestin moyen antérieur (AMG) et l'intestin moyen postérieur (PMG) composent l'intestin moyen. Le PMG comporte des cellules allongées et est 6 fois plus long que l'AMG. Cependant, l'AMG, parfois nommé estomac, est plus volumineux et possède beaucoup plus de cellules que le PMG. L'AMG peut être divisé en trois régions : l'antérieure, la centrale et la postérieure (**Figure 3**). Chacune de ces régions possède des cellules de tailles et de formes différentes. Les cellules des régions antérieures et postérieures sont cuboïdales alors que celles de la région centrale sont allongées, en forme de colonnes. La taille de ces cellules augmente au cours de la vie du puceron, mais elles ne dégénèrent pas et aucun renouvellement, donc aucune division cellulaire, n'a été décrite à ce jour. Dans l'hémocoèle, l'AMG se positionne au niveau du thorax à proximité des PSG.

3. Les glandes salivaires du puceron.

Ponsen a décrit les glandes salivaires (SG) de nombreuses espèces de pucerons. Sa description des SG de *Myzus persicae* reste à ce jour une référence pour la description morphologique de cet organe (**Figure 3B et C**). Il existe deux types de glandes salivaires : les glandes salivaires accessoires (ASG) et les principales (PSG) qui sont chacune au nombre de deux par individu. Les ASG ne sont composées que de 3 ou 4 cellules du même type. En revanche, les PSG sont composées de deux lobes symétriques comportant chacun 8 types cellulaires différents. Deux types cellulaires sont localisés dans la partie antérieure des PSG et 6 dans la partie postérieure.

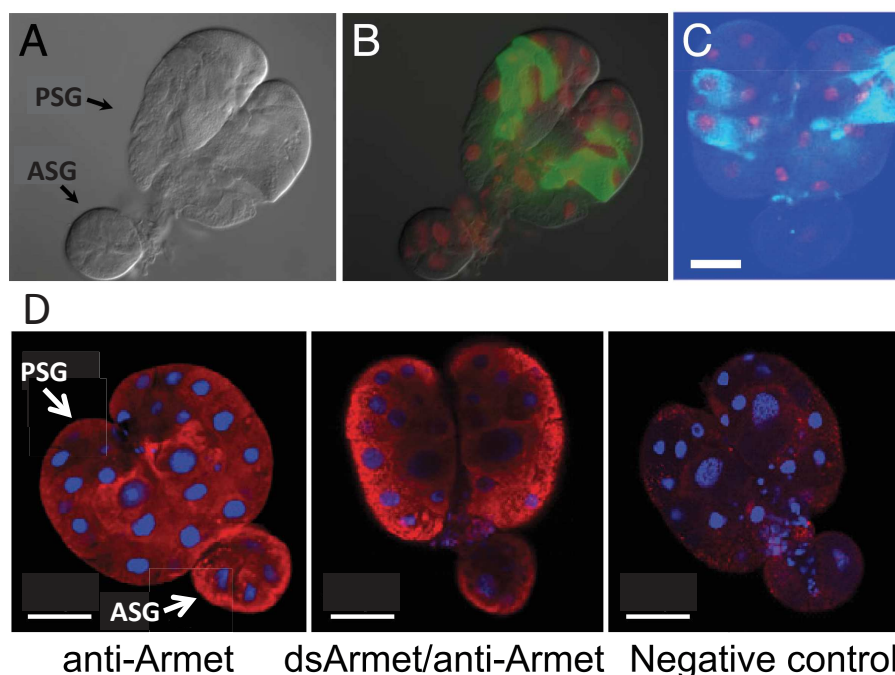


Figure 4. Localisation des effecteurs salivaires C002 et ARMET dans les glandes salivaires principales de leurs pucerons respectifs.

Visualisation en lumière transmise des glandes salivaires accessoires (ASG) et principales (PSG) du puceron *A. pisum*. B. localisation par hybridation in situ en fluorescence du transcript C002 (vert). C. Localisation de la protéine C002 à l'aide d'un anticorps anti-C002. Les noyaux sont visualisés en rouge. La barre blanche représente 50 μm (adapté de (Mutti *et al.* 2008)). D. Localisation de la protéine Armet a l'aide d'un anticorps anti-Armet dans des glandes salivaires de puceron avant (gauche) et après (centre) injection de ARNs double brin destinés à inhiber l'expression de la protéine Armet. À droite est présenté le contrôle négatif avec marquage par anticorps anti-Armet pré-incubé avec des protéines Armet recombinantes. Les noyaux sont visualisés en bleu. La barre blanche représente 100 μm (adapté de (Wang *et al.* 2015)).



Figure 5. Photo des pucerons décrits comme vecteurs du FBNSV.

Photos représentatives des 3 espèces de pucerons potentiellement vectrices des virus du genre *Nanovirus*.

Chaque type cellulaire comporte un nombre spécifique de cellules différenciées par Ponsen sur la base de l'apparence du cytoplasme (présence et densité des granules), de la forme des cellules, de la taille de leur noyau et de leur nucléole. Chaque cellule est directement reliée au canal salivaire passant au centre de chaque lobe des PSG (**Figure 3B - (Ponsen 1972)**).

Des approches de transcriptomique et protéomique ont récemment permis de mettre en évidence plus de 3603 gènes dans les GS qui coderaient pour des effecteurs putatifs. Ces gènes d'effecteurs putatifs ont été identifiés à partir de la recherche de motifs de sécrétion (peptides signaux qui permettraient la sécrétion des effecteurs dans la salive), et 740 d'entre eux sont surexprimés dans les glandes salivaires, mais pas dans d'autres organes tels que par exemple l'intestin (**Boulain 2017**). Cependant, moins de 20 effecteurs ont réellement été étudiés en détail et validés sur un plan fonctionnel. On ne connaît la localisation que de deux d'entre eux : C002 et Armet (**Figure 4**) qui semble se limiter à certaines cellules de la partie centrale des glandes salivaires (**Mutti et al. 2008; Wang et al. 2015**). En se basant sur les travaux de Ponsen, C002 pourrait être produit dans les cellules de type 2, 4 ou 5 et Armet pourrait être produit dans les cellules de type 3, 6 ou 7.

4. Les pucerons vecteurs du FBNSV

Comme indiqué dans la partie introductive de ma thèse, 3 espèces de pucerons sont connues comme capables de transmettre plus ou moins bien le FBNSV : *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis craccivora*, *Myzus persicae* (**Figure 5 - (Sicard et al. 2015)**). Les principales caractéristiques de ces vecteurs sont les suivantes:

- ***Acyrtosiphon pisum* (Harris, 1776)** : vert (clone Lusignan Luzerne 01 – LL01 utilisé pour ma thèse) ou rose (clone 210 également utilisé pour ma thèse) est un des plus grands pucerons décrits (2,3 à 4,4 mm). Il est holocyclique monœcique, mais peut également présenter un cycle anholocyclique dans les régions à climat doux. On le retrouve sur les plantes de la famille des *Fabaceae* cultivées comme le pois (d'où son nom *pisum*), les haricots, la luzerne, la fève et bien d'autres. Il peut également être trouvé sur des plantes sauvages telles que le sainfoin ou le cytise. Cette espèce est capable de transmettre plus de 30 virus non circulants (mosaïque du haricot – BCMV ou mosaïque du concombre - CMV), mais également circulants tels que les nanovirus.

- **Aphis craccivora** : noir, taille moyenne (1,4 à 2,0 mm). C'est une espèce uniquement anholocyclique, plus polyphage que *A. pisum* mais qui garde une préférence pour les fabacées.
- **Myzus persicae** : vert, d'une taille équivalente à celle de *A. craccivora* (1,2 à 2,5 mm). Il est holocyclique dioecique, mais comme *A. pisum*, il peut également être anholocyclique en l'absence d'hôte primaire ou en région à climat doux. Son hôte primaire est le prunus et il a plus de 50 espèces d'hôtes secondaires. C'est l'un des pucerons les plus étudiés pour la transmission des virus non circulants. Il est considéré comme l'une des espèces les plus dévastatrices.

5. Article : Route of a Multipartite Nanovirus across the Body of Its Aphid Vector (publié dans Journal of Virology)

a. Mise en contexte et résumé

NB : les numéros des figures citées ci-dessous correspondent aux figures de l'article

Dans cette partie de ma thèse, nous avons étudié la transmission du FBNSV par l'un de ses pucerons vecteurs, *A. pisum*. Avant nos travaux, seules trois études avaient apporté des informations sur la localisation des *Nanoviridae* au sein de leurs vecteurs (**Bressan et Watanabe 2011; Watanabe et Bressan 2013; Watanabe et al. 2016**). Ainsi, la protéine de capsid (CP) du *Banana bunchy top virus* (BBTV; *Nanoviridae*, *Babuvirus*) avait été visualisée au niveau de l'AMG et des PSG du puceron *P. nigronervosa* (**Bressan et Watanabe 2011; Watanabe et Bressan 2013**). Cependant, ces auteurs n'avaient pas déterminé la localisation subcellulaire du virus (**Watanabe et al. 2016**), ni étudié la localisation des différents segments génomiques. D'autres travaux réalisés, une sur le *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV ; *Nanoviridae*, *Nanovirus* - (**Franz et al. 1999**)) et l'autre sur le FBNSV (**Grigoras et al. 2018**) avaient permis d'établir que la protéine virale NSP (Nuclear shuttle protein, codée par le segment N) était indispensable à la transmission mais sans informer sur son rôle dans l'interaction virus-vecteur. Lorsque j'ai initié mes travaux de thèse, les connaissances sur la circulation de ces virus multipartites au sein de leurs insectes vecteurs restaient donc limitées et notre objectif a été de : (i) décrire le trajet du virus dans le vecteur, y compris au niveau intra-cellulaire, (ii) comparer la circulation des différents segments génomiques et (iii) identifier le rôle que joue NSP dans ce processus.

Nous avons cherché à co-localiser les différents composants viraux connus comme étant impliqués dans la transmission: les 8 segments génomiques, la CP et la NSP. Pour détecter l'ADN viral dans l'insecte, nous avons eu recours à l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) en utilisant dans un premier temps une sonde ciblant l'ensemble des 8 segments du FBNSV. Nous avons montré que l'ADN viral s'accumule dans l'intestin moyen antérieur (AMG) et les glandes salivaires principales (PSG) du puceron (**Figure 2B, C, E et F**). Cette localisation est donc similaire à celle décrite par Watanabe et Bressan (2011 et 2013) pour la CP du BBTV, virus qui appartient au second genre (*Babuvirus*) constituant la famille des *Nanoviridae*. Au niveau sub-cellulaire, nous avons observé que l'ADN du FBNSV se retrouve sous forme d'agrégats cytoplasmiques périnucléaires souvent polarisés (**Figure 2B**). L'ensemble des cellules de l'intestin moyen antérieur est concerné alors que seul un groupe cellulaire spécifique accumule le virus au niveau des PSG. Sur la base des travaux de (**Ponsen 1972**) qui a défini 8 types cellulaires différents dans les glandes salivaires

principales (**Figure 2D**), nous avons conclu que l'ADN viral s'accumule spécifiquement dans les cellules de type 4.

Sachant que le coût principal du « mode de vie multipartite » découle du risque de perdre un segment génomique lors de la transmission, il est important de comprendre comment les 8 segments viraux transitent dans le vecteur. Cette question prend d'autant plus de sens si l'on considère la démonstration récente de l'accumulation des différents segments du FBNSV dans des cellules distinctes de la plante hôte (**Sicard et al. 2019**) + **Figure 2 H**). Nous avons marqué des paires de segments à l'aide de sondes nucléiques spécifiques, l'une portant un fluorophore vert et l'autre un fluorophore rouge. Les paires utilisées ont été choisies selon la fréquence relative des segments dans le puceron (**Sicard et al. 2015**). Les marquages réalisés ont montré une parfaite co-localisation des deux segments, quelle que soit la paire testée, U2/U4, M/U1, C/N ou R/S, et ceci dans l'AMG et les PSG de *A. pisum* (**Figures 2 et 3**). Il paraît donc très hautement probable que les 8 segments du FBNSV transitent ensemble, en grand nombre, dans le corps du vecteur. Enfin, pour obtenir des informations complémentaires sur la circulation intra-vecteur du FBNSV, nous avons immuno-marqué la CP et la NSP. Pour chacune de ces protéines, l'immuno-marquage a mis en évidence une localisation similaire à celle de l'ADN viral dans les différents organes ciblés, AMG et cellules de type 4 des PSG, sous forme d'agrégats cytoplasmiques. Cependant, un marquage dans les cellules de type 3 des PSG a également été observé pour la CP et la NSP (**Figure 4A à 4H**). Au niveau de l'AMG, la combinaison des techniques de FISH et d'immuno-marquage a permis d'observer une co-localisation intracellulaire parfaite de l'ADN et de la CP (**Figures 4I et 4J**), mais une co-localisation hétérogène (imparfaite) entre l'ADN et la NSP (**Figures 4K et 4L**). En effet, l'ADN et la NSP localisent souvent ensemble mais pas toujours, et dans des proportions différentes selon les agrégats considérés.

Pour mieux comprendre le rôle de la protéine NSP dans la transmission, nous avons reproduit les expériences de FISH sur l'ADN viral au niveau de l'AMG de pucerons alimentés sur plantes infectées où le segment N était soit absent soit muté sur le codon d'initiation de la traduction. Les résultats montrent la nécessité absolue du segment N non muté dans les plantes infectées pour que le FBNSV puisse s'accumuler dans les cellules intestinales du puceron (**Figures 5**). Ces résultats suggèrent que la protéine NSP joue un rôle dans l'internalisation du virus dans les cellules de l'AMG et par extension peut être aussi celle des PSG. Dans le but de pouvoir par la suite purifier la NSP, nous avons infecté des plantes avec un segment N modifié de sorte à exprimer une étiquette (« tag ») 6-His fusionnée à l'extrémité N- ou C-terminale de la protéine NSP (respectivement appelé His-

NSP et NSP-His). L'ajout d'un His-tag en C-ter de NSP se traduit par l'absence de détection de la protéine NSP-His dans les plantes infectées (**Figure 5E**) et l'abolition de la transmission par pucerons. Par contre, la protéine His-NSP est produite en quantité comparable à NSP non modifiée durant l'infection de la plante hôte, mais son activité semble abolie (pas de transmission par pucerons) et l'ADN viral n'est pas détectable dans les cellules de l'AMG. Ce résultat montre que des modifications mineures de NSP affectent ses propriétés biochimiques (stabilité) et biologiques (activité)

b. Article



Route of a Multipartite Nanovirus across the Body of Its Aphid Vector

Jérémy Di Mattia,^a Marie-Stéphanie Vernerey,^a Michel Yvon,^a Elodie Piroles,^a Mathilde Villegas,^a  Yahya Gaafar,^b Heiko Ziebell,^b Yannis Michalakis,^c Jean-Louis Zeddou,^{a,d}  Stéphane Blanc^a

^aUMR BGPI, INRAE, CIRAD, Montpellier SupAgro, Université de Montpellier, Montpellier, France

^bJulius Kühn Institut, Braunschweig, Germany

^cMIVEGEC, CNRS, IRD, Université de Montpellier, Montpellier, France

^dUMR IPME, IRD, CIRAD, Université de Montpellier, Montpellier, France

Jean-Louis Zeddou and Stéphane Blanc contributed equally to the article.

ABSTRACT Vector transmission plays a primary role in the life cycle of viruses, and insects are the most common vectors. An important mode of vector transmission, reported only for plant viruses, is circulative nonpropagative transmission whereby the virus cycles within the body of its insect vector, from gut to salivary glands and saliva, without replicating. This mode of transmission has been extensively studied in the viral families *Luteoviridae* and *Geminiviridae* and is also reported for *Nanoviridae*. The biology of viruses within these three families is different, and whether the viruses have evolved similar molecular/cellular virus-vector interactions is unclear. In particular, nanoviruses have a multipartite genome organization, and how the distinct genome segments encapsidated individually transit through the insect body is unknown. Here, using a combination of fluorescent *in situ* hybridization and immunofluorescence, we monitor distinct proteins and genome segments of the nanovirus *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV) during transcytosis through the gut and salivary gland cells of its aphid vector *Acyrtosiphon pisum*. FBNSV specifically transits through cells of the anterior midgut and principal salivary gland cells, a route similar to that of geminiviruses but distinct from that of luteoviruses. Our results further demonstrate that a large number of virus particles enter every single susceptible cell so that distinct genome segments always remain together. Finally, we confirm that the success of nanovirus-vector interaction depends on a nonstructural helper component, the viral protein nuclear shuttle protein (NSP), which is shown to be mandatory for viral accumulation within gut cells.

IMPORTANCE An intriguing mode of vector transmission described only for plant viruses is circulative nonpropagative transmission, whereby the virus passes through the gut and salivary glands of the insect vector without replicating. Three plant virus families are transmitted this way, but details of the molecular/cellular mechanisms of the virus-vector interaction are missing. This is striking for nanoviruses that are believed to interact with aphid vectors in ways similar to those of luteoviruses or geminiviruses but for which empirical evidence is scarce. We here confirm that nanoviruses follow a within-vector route similar to that of geminiviruses but distinct from that of luteoviruses. We show that they produce a nonstructural protein mandatory for viral entry into gut cells, a unique phenomenon for this mode of transmission. Finally, noting that nanoviruses are multipartite viruses, we demonstrate that a large number of viral particles penetrate susceptible cells of the vector, allowing distinct genome segments to remain together.

Citation Di Mattia J, Vernerey M-S, Yvon M, Piroles E, Villegas M, Gaafar Y, Ziebell H, Michalakis Y, Zeddou J-L, Blanc S. 2020. Route of a multipartite nanovirus across the body of its aphid vector. *J Virol* 94:e01998-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01998-19>.

Editor Anne E. Simon, University of Maryland, College Park

Copyright © 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Stéphane Blanc, stephane.blanc@inra.fr.

Received 25 November 2019

Accepted 16 February 2020

Accepted manuscript posted online 26 February 2020

Published 16 April 2020

KEYWORDS aphid, circulative, insect vector, nanovirus, vector transmission, multipartite virus, nonpropagative, plant

Among hundreds of plant virus species recognized by the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), nearly 80% are transmitted from plant to plant by vectors (1). Vectors can be very diverse plant-feeding organisms or parasites (insects, mites, nematodes, and protists), but hemipteran insects (2), and particularly aphids and whiteflies, are by far the most important (1, 3). There are distinct categories of virus-vector interactions, named circulative or noncirculative depending on whether the virus penetrates and circulates within the body of its vector or more simply attaches externally to the cuticle of its mouthparts (4). In circulative transmission, the virus often replicates in the vector, as is the case for all arboviruses infecting vertebrates and for a few plant viruses in the families *Tymoviridae*, *Rhabdoviridae*, and *Reoviridae* or in the order *Bunyavirales*. An intriguing variation of circulative transmission considered to be nonpropagative has been reported solely in plant viruses (5). In this case, the virus circulates through the gut to the salivary gland (SG) cells of its insect vector but does not replicate during this process (6).

Circulative nonpropagative transmission has been reported for three economically important families of plant viruses: *Luteoviridae*, *Geminiviridae*, and *Nanoviridae*. In each case, the molecular/cellular interaction between virus and vector has not been fully elucidated, and whether viruses in these three families follow similar pathways in their respective vectors is unclear. A series of pioneering electron microscopy studies have revealed the accumulation of virus particles of distinct luteovirus species in clathrin-coated vesicles of midgut or hindgut (7–9) cells of their aphid vectors. These vesicles seemingly follow the early endosomal pathway prior to the appearance of noncoated tubular vesicles within which the virions are believed to reach the basal membrane and exit gut cells into the hemolymph (10). The transcytosis process has been shown to be similar when luteovirids cross the accessory salivary gland cellular barrier (9). For geminiviruses, and particularly the best-studied genus *Begomovirus*, a number of reports used immunolabeling of the coat protein (CP) to demonstrate that virus particles also use a clathrin-assisted endocytosis process, following the early endosomal pathway (11). The specific receptors at the level of the gut lumen are poorly known in circulative nonpropagative transmission. Only two receptor candidates, the amino peptidase N and the ephrin receptor protein, have been identified for luteoviruses (12–14), whereas no such candidates could be identified for geminiviruses. In both families, the process by which virus particles internalized in gut/salivary gland cells successfully exit the cells and escape the endosome recycling and lysosome pathway is not understood. It has been shown that the transit of the geminivirus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) across its whitefly gut cells triggers autophagy as an insect defense mechanism (15). Such a process has not been reported to date for luteoviruses. Despite important differences in their life histories, the transmission mode and the virus-vector interaction for nanoviruses are mostly inferred from knowledge acquired from geminivirus species. Very scarce empirical information is available for nanoviruses, and further investigation is needed to better comprehend circulative nonpropagative transmission and its commonalities and specificities among the three viral families.

The family *Nanoviridae* comprises two genera, *Babuvirus* and *Nanovirus*. Their genomes are composed of six and eight single-stranded circular DNA molecules, respectively, of approximately 1 kb (Fig. 1). Each genome segment encodes a single protein and is individually encapsidated in an icosahedral particle of 17 to 20 nm in diameter (16). All viruses of this family are transmitted by aphids (16), and one series of studies describes the route of the *Babuvirus Banana bunchy top virus* (BBTV) in its vector *Pentalonia nigronervosa* (17–19). By immunofluorescence labeling of the coat protein, the BBTV particles were localized in the aphid anterior midgut (AMG) and principal salivary glands (PSG) (17), reminiscent of the situation reported for geminiviruses in

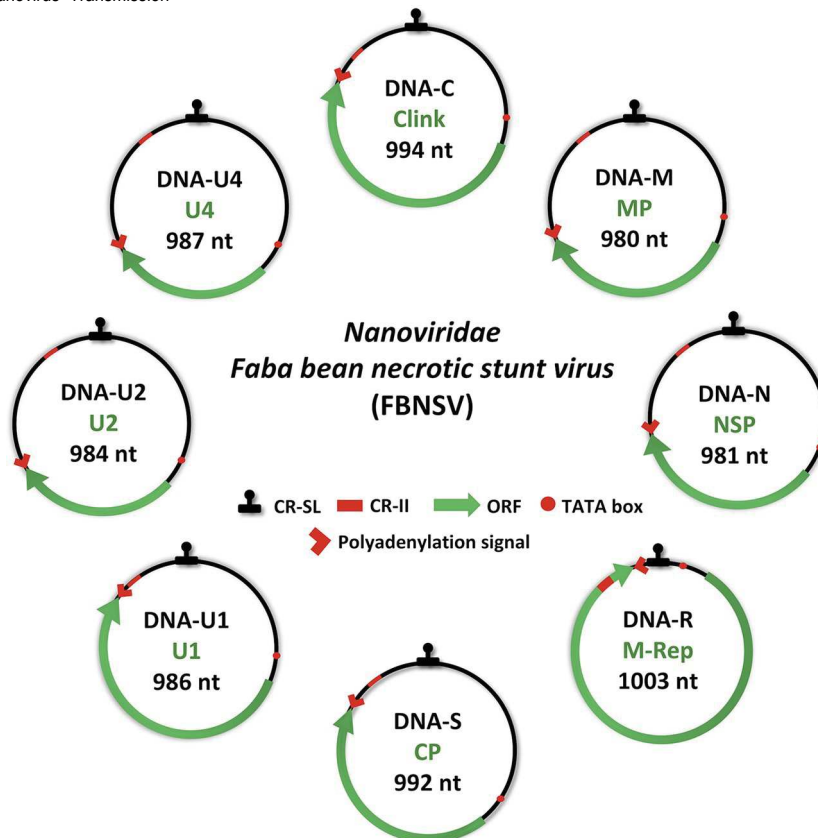


FIG 1 Genome organization of *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV).

The eight circles represent the different genomic segments. The name and size of each genome segment and the name of the encoded protein are indicated inside circles in black and green, respectively. Clink, cell cycle-linked protein; MP, movement protein; NSP, nuclear shuttle protein; M-Rep, master replication protein; CP, coat protein; U1, U2, or U4, unknown protein 1, 2, or 4. CR-SL, common stem-loop region; CR-II, common region; ORF, open reading frame; nt, nucleotides.

whiteflies. However, considering the specificities of nanoviruses, two prominent questions have not been addressed and are examined below.

One major aspect in the genome architecture of nanoviruses, contrasting with luteoviruses and (most) geminiviruses, is that they are multipartite, and so the virus population within the plant is a mixture of six to eight types of viral particles, with each type containing a distinct genome segment (20). In order to ensure successful passage of the integral genome to a new host plant, it is assumed that at least one functional particle of each type must be transmitted (21). We recently reported that the genome segments of *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV) do not all coexist in individual plant cells and suggested that the infection proceeds within the host plant through functional complementation of the distinct genes across distinct cells (22). In this intriguing pluricellular way of life, the virus can colonize host cells with a low multiplicity of infection (MOI). In previous studies tracking the BBTV within its aphid vector (17–19), only the coat protein was monitored. The actual identity of genome segments was not documented, and so it is unknown whether nanoviruses invade individual vector cells with a small or large number of virus particles, allowing the distinct genome segments to travel all together or separately from gut to salivary glands.

Another important aspect of the transmission of nanoviruses was uncovered 2 decades ago with the species *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV). Through a series of sequential acquisitions of highly and poorly transmissible virus isolates by aphid vectors, Franz and collaborators (23) concluded that, in addition to the virus particles, a viral factor, or helper component (HC), is required for virus transit through the vector.

Recently, using agroinfectious clones in which any segment can be omitted during agroinoculation, it was demonstrated that the absence of segment N in the infected plant does not affect systemic infection but totally precludes aphid transmission (24). The authors provided strong evidence that the HC of nanoviruses is the segment N-encoded nuclear shuttle protein (NSP), whose mode of action now awaits investigation.

Here, we confirm the internalization of the distinct FBNSV genome segments within the AMG and the PSG of its aphid vector *Acyrtosiphon pisum*. We demonstrate that the virus particles penetrate the aphid cells in very high numbers, allowing all genome segments to travel together in all colonized aphid cells, sharply contrasting with the situation recently described in host plants (22). We further show that the NSP is mandatory for viral accumulation into aphid gut cells. Finally, we observe that both the NSP and CP colocalize with the viral genome segments, suggesting that NSP-virus particle complexes are the viral form that cycles within the aphid body.

RESULTS

FBNSV accumulates in the anterior midgut and primary salivary glands of *Acyrtosiphon pisum*. We used fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to localize the FBNSV DNA in aphid gut and salivary gland cells. Total viral DNA was first targeted using a whole-genome probe directed against the coding sequences of all eight segments. In the aphid gut, a specific and strong fluorescent signal could be observed in most, if not all, cells of the AMG, while downstream posterior midgut and hindgut were rarely and never labeled, respectively (Fig. 2A to C). At the intracellular level, most of the signal was observed as numerous cytoplasmic perinuclear fluorescent foci, sometimes polarized on one side of the nucleus (Fig. 2B). No viral DNA could be detected in nuclei, even in those cells with the most intense signals.

In salivary glands, the viral DNA appeared exclusively accumulated in PSG and exhibited an intracellular pattern similar to that observed in AMG cells. Interestingly, the viral DNA appeared detectable only in specific cells of the PSG (Fig. 2D to F). Based on Ponsen's descriptions (25) of the PSG anatomy (Fig. 2D), we propose this specific area to correspond to type 4 cells (Fig. 2E). Other cells of the PSG and accessory salivary glands were not detectably labeled, indicating that they do not or only poorly accumulate FBNSV DNA segments.

The eight FBNSV segments travel together in their insect vector. Because FBNSV is a multipartite virus and because its eight distinct genome segments have recently been shown to accumulate in distinct cells of the host plant (21), we investigated whether they travel together or separately during their journey across the body of the aphid vector. For this purpose, we prepared segment-specific probes with distinct fluorochromes and used them in pairs. In sharp contrast to the situation earlier reported within host plants (Fig. 2H), the two segments of the pair R/S (encoding the master replication-associated protein and coat protein, respectively) appeared colocalized not only within AMG individual cells but also within each of the numerous fluorescent foci within these cells (Fig. 2G). The overall fluorescent signal was always weaker when FISH was applied to salivary glands, indicating a generally lower level of accumulation of FBNSV in this tissue. When the segment pair U2/U4 (encoding proteins 2 and 4 of unknown function, respectively) was labeled, however, the signal was sufficiently intense to similarly conclude that the two segments accumulate together in individual cells and in most, if not all, fluorescent foci within these cells (Fig. 2I).

Such systematic colocalization of distinct genome segments was confirmed in the AMG with three additional segment pairs: M/U1 (encoding the movement protein and protein 1 of unknown function, respectively), C/N (encoding the cell cycle-linked protein and the nuclear shuttle protein, respectively), and U2/U4 (Fig. 3A to C). In the PSG, solely the additional pair M/U1 yielded a weak but detectable signal, and, although barely visible, the intracellular fluorescent foci also appeared to contain both segments (Fig. 3D). The different intensities of the fluorescent signal in AMG and PSG are probably due to different levels of viral accumulation in these respective organs.

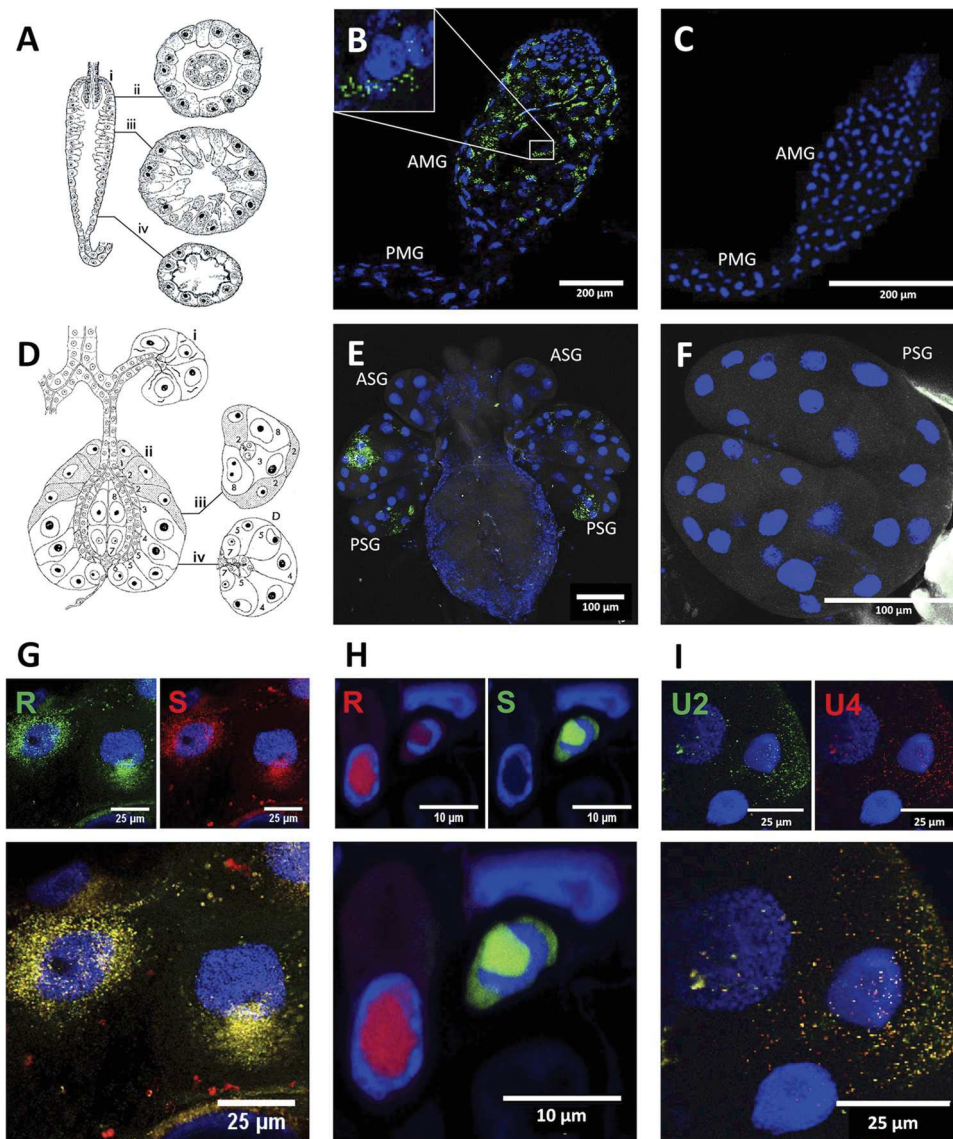


FIG 2 Localization of the DNA segments of *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV) in aphid versus that in plant cells.

Schematic drawing of the anatomy of the AMG (A) shows longitudinal (i) and transverse sections (ii to iv). Schematic drawing of the anatomy of the salivary glands (D) shows longitudinal sections of the accessory (i) and principal glands (ii) as well as transverse sections of the principal glands (iii and iv). Both panels A and D are adapted from Ponsen (25) describing the anatomy of *Myzus persicae*. Ponsen's numbering of distinct cell types (1 to 8) of the salivary glands is indicated in panel D. The accumulation of FBNSV DNA was observed in anterior midgut (AMG) of 64 viruliferous aphids from 8 experiments, and a representative image is shown in panel B. The accumulation of FBNSV DNA in a specific cell type of the principal salivary glands (PSG) was observed in 15 viruliferous aphids from 3 experiments, and a representative image is shown in panel E. In panels B and E, the viral DNA is revealed by FISH (green probe targeting all eight FBNSV segments), and nonviruliferous controls are shown in panels C and F. The respective localizations of R and S segments (probe color as indicated) are compared in AMG cells (G; representative of 24 observed aphids) and in infected faba bean phloem cells (H) (22). The respective localizations of U2 and U4 segments are compared in PSG cells (I; representative of 4 aphids observed). In panels G, H, and I, the merged-color channel image is shown at the bottom, and the corresponding split-color channel images are shown at the top. All images correspond to maximum-intensity projections. Cell nuclei are stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue). PMG, posterior midgut; ASG, accessory salivary glands.

The average number of copies of all eight segments was $1.64 \times 10^8 (\pm 1e7)$ in the head, containing the PSG, and $8.34 \times 10^9 (\pm 6e8)$ in the rest of the body (see Materials and Methods). All together, these observations suggest that all FBNSV segments are internalized in gut and salivary gland cells of their insect vector and undergo transcytosis as groups of virus particles large enough to contain one or more copies of each segment.

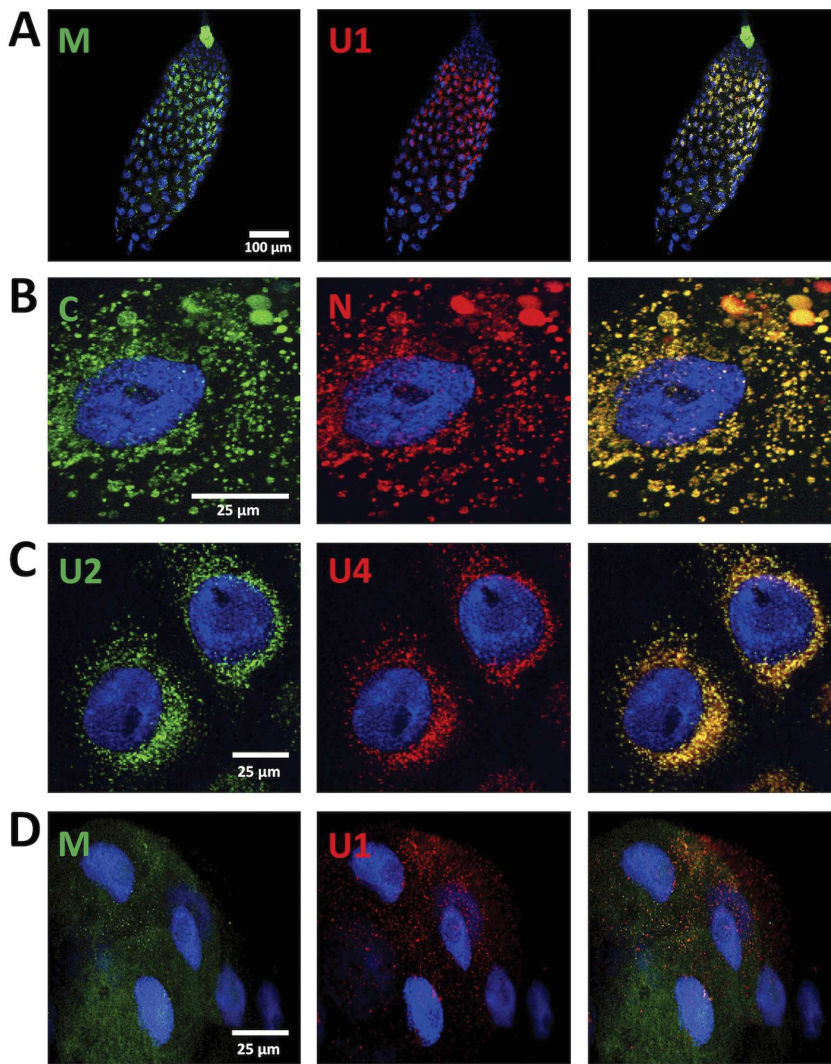


FIG 3 Colocalization of FBNSV segments in AMG and PSG.

The colors of the fluorescent probes and the targeted segment pairs are indicated. Three additional pairs of segments were tested in the AMG: 32 aphids from four experiments for the pair M/U1 and 24 aphids from three experiments for the pairs C/N and U2/U4. Illustrative images are, shown, respectively, in panels A, B, and C. In the PSG, the additional segment pair M/U1 was observed in 6 aphids from three experiments, and a representative image is shown in panel D. Split-color channels are shown in the left and middle panels whereas merged images are shown in the right panel. All images correspond to maximum-intensity projections. Cell nuclei are stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue).

Viral DNA colocalizes with CP and NSP within aphid AMG cells. To further determine the form under which the FBNSV crosses the cellular barriers within its aphid vector, we compared the localization of the FBNSV DNA to that of the two viral proteins obviously involved in vector transmission, CP and NSP. First, we looked at the localization of the CP using immunofluorescence (IF). The CP exhibited a distribution identical to that of viral DNA with very numerous cytoplasmic fluorescent foci in AMG cells (Fig. 4A). In PSG, CP-associated fluorescent foci were visible in cells of type 4, just as viral DNA, and also in the cells with the biggest nucleus, defined by Ponsen as type 3 cells (Fig. 2C and 4E). We then used a combination of FISH and IF to more precisely colocalize viral genomic DNA and the CP. In the AMG, this DNA/protein colabeling demonstrated that all intracellular foci containing viral DNA also contained the CP (Fig. 4I and J), consistent with the assumption that nanoviruses circulate from the infected plant sap, through gut cells into the hemolymph and through salivary gland cells into the saliva, as mature virus particles (26). Noticeably, some smaller CP aggregates

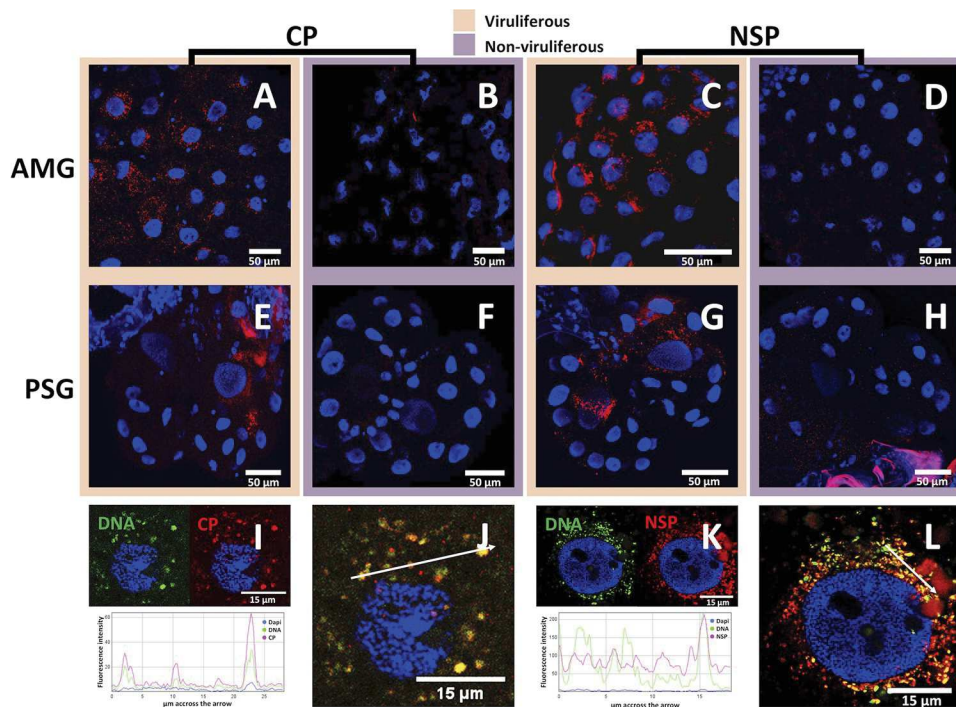


FIG 4 Localization of FBNSV DNA, CP, and NSP in AMG and PSG of *A. pisum*.

FBNSV CP is labeled by IF in the AMG (A and B) and PSG (E and F) of viruliferous (A and E) and nonviruliferous (B and F) aphids. NSP is labeled by IF in the AMG (C and D) and PSG (G and H) of viruliferous (C and G) and nonviruliferous (D and H) aphids. When viral DNA and either CP or NSP (FISH and IF) were colabeled in AMG, the DNA probe targeting all eight genome segments appears green whereas the specific CP or NSP antibody appears red (I to L). In each case, 30 aphids from three experiments were observed, and one representative image is shown. Split-color channel images in panels I and K correspond to the merged-color channel images in panels J and L, respectively. The graphics represent the colocalization profiles between either DNA (green curve) and CP (red curve) (I) or DNA (green curve) and NSP (red curve) (K). Fluorescence intensity was measured along the white arrows drawn in panels J and L. Images in panels A to H correspond to single optical sections. Cell nuclei are stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue).

appeared sometimes visible in the absence of labeling of the viral DNA. In the PSG, probably due to much weaker fluorescent signals (see the Discussion), we could not observe a reliable FISH/IF double signal, and so the colocalization of viral DNA and CP could not be confirmed in this tissue.

The same approach was applied to the NSP, which was first labeled through IF alone. In both AMG and PSG, the distribution of the NSP-associated fluorescent foci was similar to that observed for the CP (Fig. 4C and G). Combining FISH and IF, we then colabeled NSP and viral DNA in AMG cells. As observed for the CP, the intracellular foci containing FBNSV DNA appeared to contain the NSP as well (Fig. 4K and L). However, a strong heterogeneity in the relative intensities of the signals attributable to viral DNA and NSP was observed among distinct aggregates of the same cells (Fig. 4K, graph), and this is discussed further below. This result indicates that the virus particles and the NSP likely follow the same pathway during entry and accumulation within insect cells. Unfortunately, the lack of specific antibodies that would be produced in distinct animal species precluded direct colocalization assays of the NSP and CP.

FBNSV needs NSP to accumulate in AMG cells. To pave the way to the future deciphering of the NSP mode of action, we questioned whether this protein is mandatory for viral accumulation in AMG cells. Earlier work investigating the dependency of FBNSV infection on the presence/absence of individual genome segments (24) demonstrated that the absence of U4 does not affect systemic infection of host plants or aphid transmission from these plants. In contrast, the absence of segment N does not affect infection but totally abolishes aphid transmission. We thus assessed whether FBNSV could accumulate within AMG cells when the virus is acquired from source

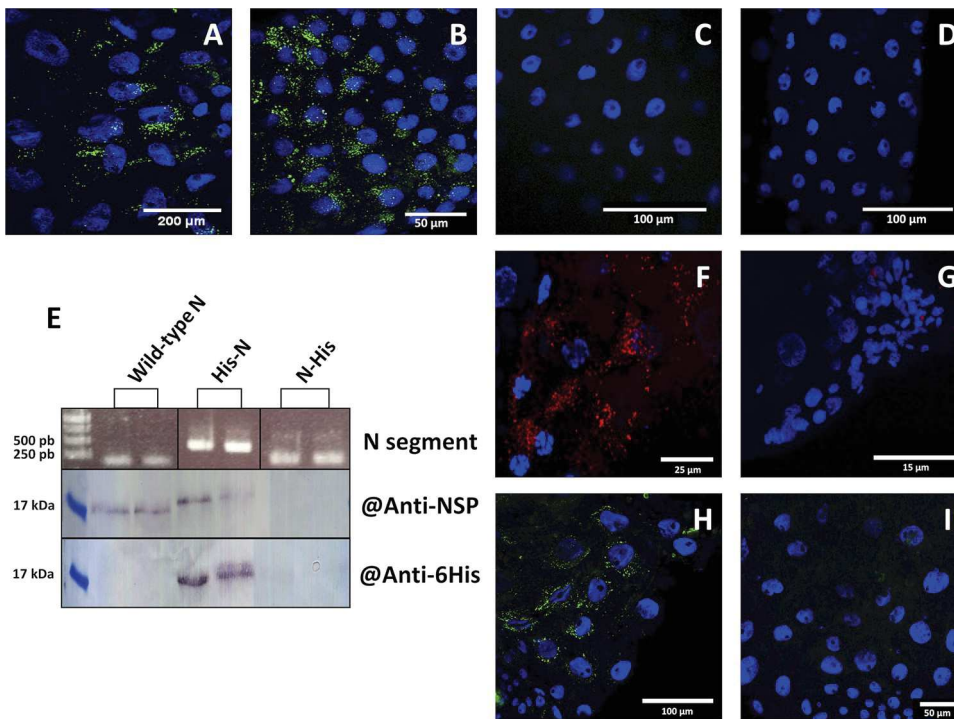


FIG 5 NSP-dependent accumulation of FBNSV DNA in the AMG of aphid vector.

FBNSV DNA is green-labeled in gut cells of aphids fed either on infected plants containing all FBNSV segments (A; representative of 15 aphids from three experiments) or on infected plants lacking segment U4 (B; representative of 5 aphids from one experiment), or on infected plants lacking segment N (C; representative of 15 aphids from three experiments), or on infected plants with all 8 segments but where the N segment has a mutation of the ATG-start codon (D; representative of 5 aphids from one experiment). The presence of the N segment and derivatives His-N and N-His in two replicate infected plants was verified by PCR using primers specific for the coding sequence of the His tag (E, top panel). The expression of NSP, His-NSP, and NSP-His proteins in infected plant tissues was evaluated by Western blotting (E) using antiserum directed against the NSP (middle panel) or His tag (bottom panel). FBNSV NSP (F and G; red) or DNA (H and I; green) are labeled in aphids fed on infected plants expressing wild-type NSP (F and H) or its derivative His-NSP fusion (G and I). Images in panels F and H are representative of 20 aphids observed from two experiments. All confocal images are maximum-intensity projections. Cell nuclei are stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue).

plants infected with FBNSV wild type, FBNSV lacking segment U4, FBNSV lacking segment N, or an FBNSV mutant in which the start codon of the NSP in the segment N has been suppressed through mutagenesis. FISH observations showed no difference in the viral DNA accumulation patterns within AMG cells of aphids fed on plants containing or lacking segment U4 (Fig. 5A and B). In contrast, the absence of segment N in infected plants totally abolished the accumulation of the viral genome in AMG cells (Fig. 5C). Similarly, the absence of accumulation of the viral genome in aphids fed on plants infected with the ATG-mutated N segment (Fig. 5D) confirmed that it is the NSP, rather than the segment N itself, that is mandatory for FBNSV accumulation within vector gut cells.

Modifications at the N or C terminus of NSP alter its function or stability. Because it would be easier to further characterize NSP derivatives fused to small purification tags, we modified the sequence of segment N in order to introduce a series of six histidines at either the N (His-NSP) or C (NSP-His) terminus of the NSP. Plants were infected with either of these constructs, and PCR detection confirmed the maintenance of the modified versions of segment N during systemic plant infection (Fig. 5E). However, while the His-NSP fusion protein accumulated to a level comparable to that of wild-type NSP in infected plant tissues, NSP-His could not be detected (Fig. 5E). The failure to detect the NSP-His fusion could be due to instability of the modified protein or mRNA or to other unknown reasons.

To assess the functionality of the His-NSP fusion produced in infected plants, we tested whether aphids could acquire and transmit the virus from these plants (Fig. 5F to I). FISH and IF, respectively, showed that no viral DNA or His-NSP fusion

accumulated detectably in AMG cells. Consistently, in two repeated experiments, aphids that acquired FBNSV from infected plants expressing His-NSP failed to transmit the virus (no infected plants out of 95 test plants; see Materials and Methods for details), while aphids fed on infected plants expressing wild-type NSP efficiently transmitted the virus (69 infected plants out of 105 test plants).

All together, these results indicate that modification at the N or C terminus of NSP has profound effects on accumulation and/or functionality of this protein in aphid vectors and further confirm that only a functional NSP can enter gut cells and assist the coentry of the CP and viral genome.

DISCUSSION

The route of FBNSV in its vector *A. pisum*. Because very few experimental data are available concerning the cellular and molecular interactions between nanoviruses and their aphid vectors, we investigated these anew in the model species *Faba bean necrotic stunt virus* transmitted by *Acyrtosiphon pisum*. The first logical step was to precisely localize the distinct viral components that are required for successful transmission: viral genomic DNA, coat protein, and the helper component NSP. Using FISH and IF to monitor these three viral components, we could definitely confirm that FBNSV specifically accumulates in the AMG and PSG, consistent with a circulative nonpropagative mode of transmission. This observation matches the reported localization of the coat protein of BBTV in its aphid vector *P. nigronervosa* (17). FBNSV and BBTV, respectively, belong to the *Nanovirus* and *Babuvirus* genera, the only two genera of the family *Nanoviridae*. It is thus most likely that the aphid AMG and PSG are the organs specifically involved in the transmission of all nanoviruses. This within-vector route is similar to that of geminiviruses transmitted by whiteflies (27) but contrasts with that of luteoviruses, which can enter and cross cells of the hindgut (7–9) and have been reported only in accessory salivary glands of their aphid vectors (9).

In the PSG, FBNSV DNA was unambiguously detected solely in type 4 cells whereas CP and NSP were detected both in type 4 and type 3 cells. At this point, because we do not have sound biological arguments that could explain the accumulation of viral coat protein and not of DNA, we assume that the lack of detection of viral DNA in type 3 cells is due to a technical bias whereby the fluorescent signal associated with FISH is weaker than that associated with IF. In any case, it will be interesting to further investigate the specific accumulation of FBNSV in PSG cells over time, as previously reported for a begomovirus in its whitefly vector (28). At this point, we cannot exclude the possibility that FBNSV could penetrate other cell types and later accumulate preferentially in cell types 3 and 4.

Intracellular localization of FBNSV. FBNSV is a single-stranded DNA (ssDNA) virus encoding a replication protein, M-Rep, that is not a DNA polymerase (29). On the basis of inference from data obtained from related geminiviruses, nanoviruses are thought to recruit a nonidentified cellular DNA polymerase for replication and accumulation in the nucleus of host plant cells (20). Within aphid vectors, we observed a cytoplasmic localization of FBNSV DNA and proteins, supporting the absence of replication. This result must be considered with care, however, because the question of viral replication within the vector has long been a matter of controversy in the related family *Gemini-viridae* (30, 31). TYLCV primarily accumulates in the cytoplasm of AMG and PSG of its whitefly vector (28), but an elusive transient replication phase has nevertheless been evidenced soon after acquisition (30). In the present study, we used aphids that were all allowed a very long acquisition access period in order to maximize the detection of viral material accumulated in the cytoplasm of the AMG and PSG over time. A small transient replicative proportion of the viral DNA could eventually remain overlooked under our experimental conditions. We have earlier reported that the FBNSV genome formula (the relative amounts of each FBNSV genome segment) changes when the virus passes from the infected plant into the aphid vector (32). Among other hypotheses, replication of the virus upon entry into insect cells could explain the formula

changes, and so the question of a transient replication phase of FBNSV within its aphid vector remains open.

Vesicles of the endosomal pathway have been suggested to be the entry route of luteoviruses and geminiviruses in their vectors, based on electron microscopy in viruliferous aphids (9) and colocalization of markers of cell organelles and on confocal microscopy in viruliferous whiteflies (11). An earlier attempt with markers of subcellular compartments to identify the accumulation sites of the nanovirus BBTV failed (19). The authors suggested that this failure could be due to the lack of markers specifically adapted to aphids. For this reason, we have not identified the subcellular compartment with which the FBNSV associates during transcytosis. Developing a large panel of aphid/whitefly-specific markers will be of great utility because the endocytosis/exocytosis pathways that are used downstream of the early endosome remain unknown for the three viral families.

The DNA and coat protein perfectly colocalized in the cytoplasmic fluorescent foci, supporting the general assumption that the FBNSV goes across cellular barriers of its aphid vector under the form of mature virus particles. A remarkable fact inspires caution, however. For both begomoviruses and nanoviruses, no distinctive virus particles could ever be visualized within any cell of an insect vector through electron microscopy. For luteoviruses, which are not much bigger (≈ 25 nm in diameter), images of virions within intracellular vesicles have long and repeatedly been published (9, 33–35). The reason precluding analogous images with begomo- and nanoviruses is intriguing. While the colocalization of DNA and coat protein indicates that the two travel together, it does not represent definitive proof that they do so as assembled virus particles.

Role of NSP in the transmission of FBNSV. Franz and collaborators (23) demonstrated the requirement of a helper component (HC) for aphid transmission of *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV). Nearly 2 decades later, the same research group (23) demonstrated that this HC is the viral NSP encoded by the N segment. HC molecules have been reported mostly in cases of noncirculative transmission, the best-known examples of which are caulimoviruses and potyviruses (4). In these cases, the HC creates a reversible molecular bridge between the virus and the insect mouthparts, a phenomenon called the “bridge hypothesis” (36), with one domain interacting with the viral coat protein (37, 38) and another interacting with receptor molecules of the vector (39–41). HCs had not been reported until recently in circulative transmission, whether propagative or not. With the discovery that the *Rice stripe tenuivirus* (RSV) (42) and FBNSV (24) have also evolved the use of an HC, the so-called “helper strategy” (36) is now found in all types of virus-vector interactions. In the case of RSV, the HC is a virus-encoded glycoprotein that binds to the CP and mediates endocytosis and entry of the virus particles inside gut cells. Here, we similarly demonstrate that the NSP of FBNSV is mandatory for viral accumulation within AMG cells and, thus, presumably for virus entry within the vector. We further show that NSP localizes, though imperfectly, in the same intracellular aggregates as viral DNA, and we can thus hypothesize that FBNSV transits within aphids as virus particle-NSP macromolecular complexes. These observations suggest that HCs have at least partly similar modes of action in noncirculative and circulative transmission: creating a molecular bridge between virus and vector. The imperfect colocalization observed for NSP and viral DNA, however, may indicate a distinct and unknown mode of action, and we believe further investigation is needed to confirm or refute the bridge hypothesis. While the NSP of the *Babuvirus* BBTV has been shown to bind CP (43, 44), the requirement of this interaction for successful transmission has not been demonstrated. Likewise, a direct binding of NSP to the cellular membranes in the AMG lumen and the identification of a putative specific receptor at this site await further research efforts. Unfortunately, investigation on the mode of action of NSP can be foreseen as a difficult task because our results demonstrate that modifications of the NSP N or C terminus to produce protein fusions

amenable to biochemical approaches lead to very low accumulation of the recombinant protein or to a loss of its biological activity.

All FBNSV genome segments colocalize within individual cells of the aphid vector. It is generally assumed that the multipartite lifestyle entails an important cost related to the probability of losing genome segments during transmission from cell to cell or host to host (21, 45, 46). For highly multipartite viruses, i.e., those with a genome composed of four or more segments, the multiplicity of infection (MOI) theoretically required for these viral systems to evolve has been predicted to be unrealistically high (21, 47). We have recently demonstrated that FBNSV can infect its host plant with its distinct genes (genome segments) separated in distinct cells by exchanging gene products across these cells (22). This capacity allows infection of plant cells at a very low MOI, likely alleviating the cost of the multipartite lifestyle within the host. In the present work we touch on the mechanisms through which all FBNSV segments may be transmitted between hosts. Obviously, the FBNSV massive accumulation in aphid cells is totally different from the low-MOI infection observed in plant cells (Fig. 2G and H offer a striking contrast). All susceptible cells of the AMG are packed with all genome segments. Although we did not formally quantify the segments' copy numbers, one can easily observe that each AMG cell contains hundreds of fluorescent foci. By using different pairs of segment-specific probes, we established that each of these foci systematically contains the two segments tested. This indicates that each focus contains numerous distinct segments and most probably all eight. We can thus conservatively conclude that several hundreds to thousands of virus particles enter and accumulate over time within each cell of the AMG. In the PSG, the fluorescent signal was weaker, with some foci eventually containing a dominant color (so perhaps only one segment of the tested pair), indicating a reduction of the number of viral particles accumulated in this organ. It is likely that, as described for geminiviruses (48), FBNSV is primarily stored in the AMG and slowly released into the hemolymph to reach the salivary glands and, from there, the saliva. The success of each genome segment during this transit and after inoculation into new plants is uncertain since the probability of successful transmission by individual aphids is ~40% (47); the transmission failures could potentially be due to the lack of successful transmission of all genomic segments. It is conceivable that, on the one hand, a low viral flow from the AMG viral stock through the salivary glands allows viruliferous aphids to release viral particles and to possibly transmit virus during their whole life span. On the other hand, the much weaker virus accumulation in the salivary glands suggests that the number of viral particles released in each new visited plant is so small that single aphids often fail to transmit the virus. We cannot quantify precisely the number of virus particles in the salivary glands, but this weaker accumulation is at least qualitatively compatible with the very low numbers of copies of each segment estimated to be transmitted by aphids during host-to-host transmission (47).

MATERIALS AND METHODS

Virus isolate and clones, host plant, and aphid colony. The FBNSV was first isolated from faba bean in Ethiopia in 1997 (49) and then characterized in 2009 (50). Each of the eight FBNSV genome segments encodes only one protein: segment C encodes the cell cycle-linked protein (clink), M encodes the movement protein (MP), N encodes the nuclear shuttle protein (NSP), S encodes the coat protein (CP), R encodes the master replication-associated protein (M-Rep), and U1, U2, and U4 encode proteins of unknown functions (Fig. 1). Each genome segment of this isolate has been inserted as a head-to-tail dimer into the binary plasmid pBin19 to create eight plasmids together constituting the FBNSV infectious clone (50).

With the aim to purify an active NSP derivative, we added a hexahistidine (His) tag at the C or N terminus of this protein using a Q5 site-directed mutagenesis kit (NEB). The plasmid encoding NSP-His was constructed by inserting the sequence 5'-CATCATCATCACCACCAC-3' just before the stop codon of the coding sequence of the DNA-N segment (GenBank accession no. [GQ150782](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GQ150782)) in the plasmid pCambia 2300-N-SL (51) to generate pCambia 2300-N-His-SL. The plasmid encoding His-NSP was constructed by inserting the same sequence immediately after the initiating ATG of DNA-N in pCambia 2300-N-SL to generate pCambia 2300-His-N-SL. The sequences of the primers used for these two constructs are listed in Table 1. We refer to these NSPs His tagged at their C or N terminus as NSP-His or His-NSP, respectively. The correct insertion of the series of six histidine codons was confirmed by Sanger sequencing. Plasmids

Primer function and target DNA ^a	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
FISH		
C	ATGGGTCTGAAATATTTCTC	TTAATTAATTACAATCTCC
M	GCTGCGTATCAAGACGAC	TTCTAGCATCCCAATTCCTTTC
N	TGGCAGATTGGTTTTCTAGT	TTCTGAGTGAATGTACAATAAACATTT
R	ACATTAATAATCCTCTCTCTCCTA	CCTATCATCACTAAACATGCC
S	AAATGGTGAGCAATTGGAA	GCCTATGATAGTAATCATATCTTGACA
U1	TTGGTCGATTATTTGTTGGTT	AATATCTCATTAGCATTAAATACATTTGAA
U2	TTATGGATGCCGGCTTT	CATCAAGTATTAGAATAACGAACCTGA
U4	AGCAGGTTATCGAATGTAG	ATAGATCCCACAATCGCT
Mutagenesis		
N-His	CACCACCACGCAGATTGGTTTTCTAGTC	ATGATGATGCATTTTTCTGCAACTTCC
His-N	CACCACCCTAATTAGTTGTGATGATGTAATTAATAATAATT	ATGATGATGCACITTTGATTCTGAGTGAATG
Control His		
ATG-His	ATGCATCATCATCACCACCAC	GTTCTGTTTCCACCATAGAAACTAC
His-TAA	GCATGAAAGACAAGCTCAACG	TTAGTGGTGGTGATGATGATG

^aPrimers were used to amplify the coding sequence of each segment for segment-specific fluorescent labeling during FISH, to generate the pCambia 2300-His-N-SL or pCambia 2300-N-His-SL (mutagenesis), and to control the presence of DNA-His-N or DNA-N-His in infected plants (control His).

pCambia 2300-N-His-SL and pCambia 2300-His-N-SL were finally transferred to *Agrobacterium tumefaciens* COR308 for subsequent agroinoculation in faba bean host plants.

Faba bean (*Vicia faba* cv. Sevilla; Vilmorin) was used as the host plant in all agroinoculation experiments. Ten-day-old plantlets were agroinoculated with the FBNSV infectious clone as described previously (50). In some cases, the complete set of eight cloned segments was used, and in other cases either the cloned segment N or U4 was omitted. Faba beans were maintained in growth chambers under a 13/11-h day/night photoperiod at a temperature of 26/20° C day/night and 70% hygrometry. The soil of each potted plant was treated with a solution of 2 g of Trigard 75 WP (24923; Syngenta) in 5 liters of water to avoid the development of sciarid flies. All FBNSV-infected plants were analyzed by quantitative PCR (qPCR) to control for the presence/absence of each inoculated segment.

Aphid colonies of *Acyrtosiphon pisum* (clones 210 and LSR1) were reared on either FBNSV-infected (viruliferous aphids) or healthy (nonviruliferous aphids) plants. Every week, aphids were transferred to new plants, and the colonies were maintained under a 16/8-h day/night photoperiod at a temperature of 23/18° C day/night.

For practical space reasons, pea (*Pisum sativum* cv. Provencal; Vilmorin) was used as the recipient plant during transmission experiments.

Preparation of aphid midguts and salivary glands. To facilitate the dissection and to get insects with an important virus load, we used adult aphids from the colony maintained on infected plants. To eliminate the virus present in the lumen of the gut, aphid individuals were purged by a 24-h acquisition access period on water through Parafilm membrane as described previously (52). Guts and salivary glands of aphids were dissected in 1× phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) and fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) prepared in 1× PBS for 20 min. Dissected organs were then incubated in 0.1 M glycine, pH 7.4, for at least 15 min in order to stop the fixation reaction. For posterior FISH treatments, samples were then submitted to a discoloration step of 20 min in 30% H₂O₂ and kept in 1× PBS at 4° C until use (maximum storage time, 3 weeks). When IF was applied to the samples, either alone or in combination with FISH, this discoloration step was omitted.

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and immunofluorescence (IF). Fluorescent DNA probes specific to each of the eight FBNSV segments were prepared exactly as described previously (22, 53). Briefly, the coding sequence of each FBNSV segment was first amplified by PCR. PCR products from individual segments or a mixture thereof were then used as templates for the probe synthesis by random priming and incorporation of Alexa Fluor-labeled dUTP, using a BioPrime DNA labeling system kit (Invitrogen). The primer pairs used to amplify the coding sequence of each segment were those described in Sicard et al. (22). For segment-specific labeling, amplified coding sequences of C, M, R, or U2 were labeled with Alexa Fluor 488 (green), and those of N, S, U1, or U4 were labeled with Alexa Fluor 568 (red). For detection of FBNSV DNA, organs kept in 1× PBS were rinsed three times for 5 min in hybridization buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 0.9 M NaCl, 0.01% SDS, and 30% formamide) (54) and then incubated with the fluorescent probes (diluted 1/30 in hybridization buffer) overnight at 37° C.

Labeling was stopped by three rinses in hybridization buffer followed by one rinse in 1× PBS.

Samples were mounted on microscope slides in Vectashield antifade mounting medium (Vector Laboratories) (22) and observed with a Zeiss LSM700 confocal microscope equipped with a 10×, 20×, 40×, or 63× objective. For localization of the coat protein, we used a mix of three previously described (50, 55) mouse monoclonal antibodies (MAbs; FBNYV-1-1F2, FBNYV-2-1A1, and FBNYV-3-4F2). This mix was named FBNSV-FBNYV anti-CP and used at a 1/200 dilution. For detection of the NSP, we used the mouse monoclonal antibody FBNSV-NSP Mab 1-3G9 (24) diluted 1/200. Dissected anterior midgut (AMG) and salivary gland (SG) samples were incubated for 10 min with 1 µg/µl of proteinase K (PK) to increase the tissue permeability (56). Then, samples were rinsed three times for 5 min in 0.1 M glycine, pH 7.4, and

twice in $1\times$ PBS to stop the PK treatment, and a second fixation was performed in 2% PFA. After this second PFA fixation, we incubated the organs in a $1\times$ PBS and 5% bovine serum albumin (BSA) solution for 1.5 h to saturate the nonspecific fixation sites. Then, AMG and SG samples were incubated with the primary antibody in $1\times$ PBS-5% BSA overnight at 4° C and with the secondary antibody (goat anti-mouse Alexa Fluor 594 IgG conjugate, diluted 1/250; Life Technologies) in $1\times$ PBS-5% BSA for 1 h at 37° C. After each antibody incubation, three rinses in $1\times$ PBS- 0.2% Triton (0.2% PBST) were performed. The samples were mounted on microscope slides. All images were taken at a resolution of 512 by 512 or 1,024 by 1,024 pixels.

When FISH and IF were combined on the same samples, after initial fixation in 4% PFA, PK treatment was carried out before FISH labeling, which was always applied prior to IF. We used ImageJ software, version 1.4.3.67, to analyze images. The overall intensity of green, red, and blue signals was adjusted for each image as described in Sicard et al. (22).

Transmission tests with the mutated NSP. Faba bean plantlets were agroinoculated with the seven wild-type plasmids of the FBNSV infectious clone, C, M, R, S, U1, U2, and U4, plus either pCambia 2300-N-His-SL or pCambia 2300-His-N-SL. At 21 days postinoculation (21 dpi), plants were tested by PCR or qPCR (see details in the next section) for the presence of the complete set of segments. Production of NSP-His or His-NSP in infected plants was controlled by Western blotting (WB). A piece of 0.6 g of an infected plant stem was finely ground in liquid nitrogen using a mortar. Then, the powdered tissue was further homogenized in 1,800 μ l of extraction buffer (20 mM Tris-HCl, 0.2% Na_2SO_3 , and 0.2% SDS) maintained on ice. The resulting crude extract was incubated under agitation at room temperature for 20 min and at 4° C for 1 h, prior to centrifugation at $8,000\times g$ for 15 min. Twenty microliters of supernatant was used for the WB analysis. As a primary antibody, we used either the rabbit FBNSV IgG 1511389 C-terminal anti-NSP antibody (produced from the NSP peptide sequence C-QYLKKEDEYRRKFI) or a mouse 6 \times His tag antibody (Invitrogen). The secondary antibody was an anti-mouse or -rabbit IgG coupled with alkaline phosphatase (produced in goat; Sigma). Finally, the membrane was revealed in a solution containing alkaline phosphatase substrate (0.15 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate [BCIP], 0.30 mg/ml nitroblue tetrazolium [NBT], 100 mM Tris buffer, and 5 mM MgCl_2 at pH 9.25 to 9.75; Sigma).

Aphids reared on plants inoculated with plasmid pCambia 2300-N-His-SL or pCambia 2300-His-N-SL were used to observe the localization of the NSP derivatives in AMG and for transmission testing. For transmission tests, L1-stage larvae were deposited on infected faba bean plants for an acquisition access period (AAP) of 3 days and transferred to healthy pea plantlets for an inoculation access period (IAP) of 3 days. Aphids were then killed with insecticide (1 g/liter Pirimor in water; Certis), and plants were observed for the appearance of symptoms 21 days after inoculation. Three experiments were run in parallel, one with plants infected with the eight wild-type segments and two others with plants infected with seven wild-type segments and either pCambia 2300-N-His-SL or pCambia 2300-His-N-SL.

DNA extraction and quantitative real-time PCR. Extraction of total DNA from healthy or FBNSV-infected plants was performed using three leaf disks (0.6 cm each) from the two upper leaf levels squashed onto a Whatman paper. The corresponding piece of Whatman paper was then placed into a 200- μ l filter tip. A total of 100 μ l of modified Edwards buffer (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM EDTA, 250 mM NaCl, 0.5% SDS, 1% polyvinylpyrrolidone 40 [PVP40], 0.2% ascorbic acid) was added to the Whatman paper disk, and the filter tip was placed on the top of a PCR plate and centrifuged at $5,000\times g$ for 15 s. One hundred microliters of isopropanol was added to the liquid recovered down in the well of the PCR plate and further centrifuged for 25 min at $5,000\times g$. The supernatant was discarded, and the pellet was washed with 100 μ l of 70% ethanol and resuspended in 50 μ l of distilled water.

Total DNA was extracted from pools of five dissected heads or bodies of viruliferous aphids, as previously described (32). Twenty pools were used to estimate by qPCR the average number of copies of the eight FBNSV genome segments accumulating in each of these body parts. qPCR was carried out on a LightCycler 480 thermocycler (Roche). A LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR green I kit (Roche) was used according to the manufacturer's instructions using 5 μ l of the $2\times$ qPCR Mastermix,

2.5 to 2.7 μ l of H_2O , 0.3 to 0.5 μ l of the primer mixes (depending of the primers; 0.3 μ M final concentration for C, M, and S and 0.5 μ M final concentration for the other segments), and 2 μ l of DNA sample (diluted 10-fold in H_2O) as the matrix. The FBNSV pair of primers used has been described in Sicard et al. (57). Forty qPCR cycles of 95° C for 10 s, 60° C for 10 s, and 72° C for 10 s were applied to the samples. Post-PCR data analysis was as described previously (58). The plant extracts were also tested by standard PCR to verify the presence of the His tag coding sequence in the segment N, using specific primer pairs (Table 1).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to B. Gronenborn, T. Timchenko, and J. Vetten for providing antibodies against the CP and NSP of FBNSV. We acknowledge the much-valued help of S. Leblaye with all plant production and aphid maintenance, as well as with the agroinoculation of the FBNSV infectious clone.

This work was supported by ANR grants ANR-14-CE02-0014-01 and ANR-18-CE92-0028-01. J.D.M. acknowledges support from the University of Montpellier; S.B., M.Y., M.-S.V., E.P., and M.V. received support from INRA-SPE; J.-L.Z. and Y.M. received support from IRD; Y.M. received support from CNRS; and Y.G. and H.Z. received support from JKI Braunschweig Germany.

REFERENCES

1. Hogenhout SA, Ammar el D, Whitfield AE, Redinbaugh MG. 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu Rev Phytopathol* 46:327–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.022508.092135>.
2. Ng JC, Perry KL. 2004. Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Mol Plant Pathol* 5:505–511. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00240.x>.
3. Nault LR. 1997. Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Ann Entomol Soc Am* 90:521–541. <https://doi.org/10.1093/aesa/90.5.521>.
4. Blanc S, Drucker M, Uzest M. 2014. Localizing viruses in their insect vectors. *Annu Rev Phytopathol* 52:403–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045920>.
5. Blanc S, Gutierrez S. 2015. The specifics of vector transmission of arboviruses of vertebrates and plants. *Curr Opin Virol* 15:27–33. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.07.003>.
6. Gray S, Cilia M, Ghanim M. 2014. Circulative, “nonpropagative” virus transmission: an orchestra of virus-, insect-, and plant-derived instruments. *Adv Virus Res* 89:141–199. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800172-1.00004-5>.
7. Gray SM, Gildow FE. 2003. Luteovirus-aphid interactions. *Annu Rev Phytopathol* 41:539–566. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.012203.105815>.
8. Reinbold C, Herrbach E, Brault V. 2003. Posterior midgut and hindgut are both sites of acquisition of Cucurbit aphid-borne yellows virus in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *J Gen Virol* 84:3473–3484. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19415-0>.
9. Brault V, Herrbach E, Reinbold C. 2007. Electron microscopy studies on luteovirus transmission by aphids. *Micron* 38:302–312. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2006.04.005>.
10. Ali M, Anwar S, Shuja MN, Tripathi RK, Singh J. 2018. The genus luteovirus from infection to disease. *Eur J Plant Pathol* 151:841–860. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1425-8>.
11. Xia WQ, Liang Y, Chi Y, Pan LL, Zhao J, Liu SS, Wang XW. 2018. Intracellular trafficking of begomoviruses in the midgut cells of their insect vector. *PLoS Pathog* 14:e1006866. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006866>.
12. Linz LB, Liu S, Chougule NP, Bonning BC. 2015. In vitro evidence supports membrane alanyl aminopeptidase N as a receptor for a plant virus in the pea aphid vector. *J Virol* 89:11203–11212. <https://doi.org/10.1128/JVI.01479-15>.
13. Tang SL, Linz LB, Bonning BC, Pohl NL. 2015. Automated solution-phase synthesis of insect glycans to probe the binding affinity of pea enation mosaic virus. *J Org Chem* 80:10482–10489. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b01428>.
14. Mulot M, Monsion B, Boissinot S, Rastegar M, Meyer S, Bochet N, Brault V. 2018. Transmission of turnip yellows virus by *Myzus persicae* is reduced by feeding aphids on double-stranded RNA targeting the ephrin receptor protein. *Front Microbiol* 9:457. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00457>.
15. Wang LL, Wang XR, Wei XM, Huang H, Wu JX, Chen XX, Liu SS, Wang XW. 2016. The autophagy pathway participates in resistance to tomato yellow leaf curl virus infection in whiteflies. *Autophagy* 12:1560–1574. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1192749>.
16. Vetten HJ, Dale JL, Grigoras I, Gronenborn B, Harding R, Randles JW, Thomas JE, Timchenko T, Yeh HH. 2011. *Nanoviridae*, p 395–404. In King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (ed), *Virus taxonomy*. Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, London, United Kingdom.
17. Bressan A, Watanabe S. 2011. Immunofluorescence localisation of Banana bunchy top virus (family Nanoviridae) within the aphid vector, *Pentalonia nigronervosa*, suggests a virus tropism distinct from aphid-transmitted luteoviruses. *Virus Res* 155:520–525. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.12.005>.
18. Watanabe S, Bressan A. 2013. Tropism, compartmentalization and retention of banana bunchy top virus (Nanoviridae) in the aphid vector *Pentalonia nigronervosa*. *J Gen Virol* 94:209–219. <https://doi.org/10.1099/vir.0.047308-0>.
19. Watanabe S, Borthakur D, Bressan A. 2016. Localization of Banana bunchy top virus and cellular compartments in gut and salivary gland tissues of the aphid vector *Pentalonia nigronervosa*. *Insect Sci* 23:591–602. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12211>.
20. Gronenborn B. 2004. Nanoviruses: genome organisation and protein function. *Vet Microbiol* 98:103–109. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.10.015>.
21. Iranzo J, Manrubia SC. 2012. Evolutionary dynamics of genome segmentation in multipartite viruses. *Proc Biol Sci* 279:3812–3819. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.1086>.
22. Sicard A, Piroles E, Gallet R, Vernerey MS, Yvon M, Urbino C, Peterschmitt M, Gutierrez S, Michalakakis Y, Blanc S. 2019. A multicellular way of life for a multipartite virus. *Elife* 8:e43599. <https://doi.org/10.7554/eLife.43599>.
23. Franz AW, van der Wilk F, Verbeek M, Dullemans AM, van den Heuvel JF. 1999. Faba bean necrotic yellows virus (genus Nanovirus) requires a helper factor for its aphid transmission. *Virology* 262:210–219. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9904>.
24. Grigoras I, Vetten HJ, Commandeur U, Ziebell H, Gronenborn B, Timchenko T. 2018. Nanovirus DNA-N encodes a protein mandatory for aphid transmission. *Virology* 522:281–291. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2018.07.001>.
25. Ponsen MB. 1972. The site of potato leafroll virus multiplication in its vector, *Myzus persicae*: an anatomical study. H. Veenman, Wageningen, The Netherlands.
26. Whitfield AE, Falk BW, Rotenberg D. 2015. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* 479–480:278–289. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2015.03.026>.
27. Czosnek H, Hariton-Shalev A, Sobol I, Gorovits R, Ghanim M. 2017. The incredible journey of begomoviruses in their whitefly vector. *Viruses* 9:e273. <https://doi.org/10.3390/v9100273>.
28. Wei J, Zhao JJ, Zhang T, Li FF, Ghanim M, Zhou XP, Ye GY, Liu SS, Wang XW. 2014. Specific cells in the primary salivary glands of the whitefly *Bemisia tabaci* control retention and transmission of begomoviruses. *J Virol* 88:13460–13468. <https://doi.org/10.1128/JVI.02179-14>.
29. Timchenko T, de Kouchkovsky F, Katul L, David C, Vetten HJ, Gronenborn B. 1999. A single rep protein initiates replication of multiple genome components of faba bean necrotic yellows virus, a single-stranded DNA virus of plants. *J Virol* 73:10173–10182. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.12.10173-10182.1999>.
30. Pakkianathan BC, Kongsedolov S, Lebedev G, Mahadav A, Zeidan M, Czosnek H, Ghanim M. 2015. Replication of tomato yellow leaf curl virus in its whitefly vector, *Bemisia tabaci*. *J Virol* 89:9791–9803. <https://doi.org/10.1128/JVI.00779-15>.
31. Sánchez-Campos S, Rodríguez-Negrete EA, Cruzado L, Grande-Pérez A, Bejarano ER, Navas-Castillo J, Moriones E. 2016. Tomato yellow leaf curl virus: no evidence for replication in the insect vector *Bemisia tabaci*. *Sci Rep* 6:30942. <https://doi.org/10.1038/srep30942>.
32. Sicard A, Zeddou JL, Yvon M, Michalakakis Y, Gutierrez S, Blanc S. 2015. Circulative nonpropagative aphid transmission of nanoviruses: an oversimplified view. *J Virol* 89:9719–9726. <https://doi.org/10.1128/JVI.00780-15>.
33. Harris KF, Bath JE. 1972. The fate of pea enation mosaic virus in its pea aphid vector, *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Virology* 50:778–790. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(72\)90432-1](https://doi.org/10.1016/0042-6822(72)90432-1).
34. Garret A, Kerlan C, Thomas D. 1993. The intestine is a site of passage for potato leafroll virus from the gut lumen into the haemocoel in the aphid vector, *Myzus persicae* Sulz. *Arch Virol* 131:377–392. <https://doi.org/10.1007/bf01378639>.
35. Gildow F. 1993. Evidence for receptor-mediated endocytosis regulating luteovirus acquisition by aphids. *Phytopathology* 83:270–277. <https://doi.org/10.1094/Phyto-83-270>.
36. Pirone TP, Blanc S. 1996. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* 34:227–247. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.227>.
37. Schmidt I, Blanc S, Esperandieu P, Kuhl G, Devauchelle G, Louis C, Cerutti M. 1994. Interaction between the aphid transmission factor and virus particles is a part of the molecular mechanism of cauliflower mosaic virus aphid transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8885–8889. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.19.8885>.
38. Blanc S, Lopez-Moya JJ, Wang R, Garcia-Lampasona S, Thornbury DW, Pirone TP. 1997. A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* 231:141–147. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8521>.
39. Blanc S, Ammar ED, Garcia-Lampasona S, Dolja VV, Llave C, Baker J, Pirone TP. 1998. Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J Gen Virol* 79:3119–3122. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-12-3119>.

40. Moreno A, Hebrard E, Uzeit M, Blanc S, Fereres A. 2005. A single amino acid position in the helper component of cauliflower mosaic virus can change the spectrum of transmitting vector species. *J Virol* 79: 13587–13593. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.21.13587-13593.2005>.
41. Uzeit M, Gargani D, Drucker M, Hebrard E, Garzo E, Candresse T, Fereres A, Blanc S. 2007. A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17959–17964. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706608104>.
42. Lu G, Li S, Zhou C, Qian X, Xiang Q, Yang T, Wu J, Zhou X, Zhou Y, Ding XS, Tao X. 2019. Tenuivirus utilizes its glycoprotein as a helper component to overcome insect midgut barriers for its circulative and propagative transmission. *PLoS Pathog* 15:e1007655. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007655>.
43. Ji XL, Yu NT, Qu L, Li BB, Liu ZX. 2019. Banana bunchy top virus (BBTV) nuclear shuttle protein interacts and re-distributes BBTV coat protein in *Nicotiana benthamiana*. *3 Biotech* 9:121. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1656-1>.
44. Yu N, Wang J, Yu N, Zheng X, Zhou Q, Liu Z. 2019. Bioinformatics analysis of the interaction between coat protein and nuclear shuttle protein in babuvirus. *Am J Plant Sci* 10:622–630. <https://doi.org/10.4236/ajps.2019.104045>.
45. Sicard A, Michalakakis Y, Gutierrez S, Blanc S. 2016. The strange lifestyle of multipartite viruses. *PLoS Pathog* 12:e1005819. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005819>.
46. Lucia-Sanz A, Manrubia S. 2017. Multipartite viruses: adaptive trick or evolutionary treat? *NPJ Syst Biol Appl* 3:34. <https://doi.org/10.1038/s41540-017-0035-y>.
47. Gallet R, Fabre F, Thebaud G, Sofonea MT, Sicard A, Blanc S, Michalakakis Y. 2018. Small bottleneck size in a highly multipartite virus during a complete infection cycle. *J Virol* 92:e00139-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00139-18>.
48. Czosnek H, Ghanim M, Ghanim M. 2002. The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci*—insights from studies with tomato yellow leaf curl virus. *Ann Appl Biol* 140:215–231. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2002.tb00175.x>.
49. Franz A, Makkouk KM, Vetten HJ. 1997. Host range of faba bean necrotic yellows virus and potential yield loss in infected faba bean. *Phytopathol Mediterr* 36:94–103.
50. Grigoras I, Timchenko T, Katul L, Grande-Perez A, Vetten HJ, Gronenborn B. 2009. Reconstitution of authentic nanovirus from multiple cloned DNAs. *J Virol* 83:10778–10787. <https://doi.org/10.1128/JVI.01212-09>.
51. Sicard A. 2014. Fonctionnement des populations de virus multipartites de plantes au cours des différentes étapes de leur cycle de vie. PhD thesis. INRA CIRAD SupAgro, Montpellier, France.
52. Akey DH, Beck SD. 1971. Continuous rearing of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, on a holidic diet. *Ann Entomol Soc Am* 64:353–356. <https://doi.org/10.1093/aesa/64.2.353>.
53. Vernerey M, Pirolles P, Sicard A. 2019. Localizing genome segments and protein products of a multipartite virus in host plant cells. *Bio Protoc* 9:e3443.
54. Ghanim M, Brumin M, Popovski S. 2009. A simple, rapid and inexpensive method for localization of Tomato yellow leaf curl virus and Potato leafroll virus in plant and insect vectors. *J Virol Methods* 159:311–314. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.04.017>.
55. Franz A, Makkouk KM, Katul L, Vetten HJ. 1996. Monoclonal antibodies for the detection and differentiation of Faba bean necrotic yellows virus isolates. *Ann Appl Biol* 128:255–268. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1996.tb07321.x>.
56. Lin GW, Chang CC. 2016. Identification of critical conditions for immunostaining in the pea aphid embryos: increasing tissue permeability and decreasing background staining. *J Vis Exp* 108:e53883. <https://doi.org/10.3791/53883>.
57. Sicard A, Yvon M, Timchenko T, Gronenborn B, Michalakakis Y, Gutierrez S, Blanc S. 2013. Gene copy number is differentially regulated in a multipartite virus. *Nat Commun* 4:2248. <https://doi.org/10.1038/ncomms3248>.
58. Gallet R, Fabre F, Michalakakis Y, Blanc S. 2017. The number of target molecules of the amplification step limits accuracy and sensitivity in ultradeep-sequencing viral population studies. *J Virol* 91:e00561-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00561-17>.

6. Travaux complémentaires à l'article 1

a. His-tag Interne

Une troisième insertion de Tag-6-His, non mentionné dans cette publication, a été réalisée. Nous avons aligné les séquences de plusieurs NSP de différents nanovirus afin d'identifier une région peu conservée et donc potentiellement modifiable sans conséquence majeure sur l'activité biologique. Dans une telle série de 8 acides aminés peu conservés, nous avons remplacé les 6 premiers (positions 19 à 24) par une série d'histidines. Nous avons tout d'abord contrôlé par qPCR la capacité de ce segment N modifié à se répliquer et à se maintenir dans les plantes infectées, puis réalisé des tests de transmission à partir de ces plantes. La transmission ayant été négative, nous n'avons pas poussé plus avant les investigations avec ce mutant de NSP portant une étiquette 6-His interne.

b. Localisation du FBNSV dans les AMG de puceron par microscopie électronique

Marie-Stéphanie Vernerey a initié des recherches pour visualiser le virus par microscopie électronique à transmission (MET) afin de compléter nos travaux de localisation des composants viraux du FBNSV réalisés en microscopie confocale.

Matériels et méthodes

Dans le cas d'échantillons dédiés à des expériences d'immunolocalisation, les AMG du puceron *A. pisum* sont disséqués sous loupe binoculaire dans une goutte de tampon cacodylate de sodium (0.1 M à pH 7.2) puis immédiatement fixés 2 heures à 4°C dans une solution à 2% de glutaraldéhyde dilué dans ce même tampon. Trois lavages sont réalisés au tampon cacodylate de sodium (pour éliminer le glutaraldéhyde). On procède ensuite à la déshydratation des tissus par passage des AMG dans des bains de concentrations croissantes en éthanol (respectivement 30 %, 50 % et 70 %) pendant 30 minutes à 4°C. La dernière déshydratation est réalisée dans une solution à 90 % d'éthanol durant 30 minutes à -20°C. Une fois les échantillons déshydratés, les AMG sont inclus dans une résine. L'inclusion est faite par imprégnation dans des bains successifs de concentrations croissantes en résine London Resin Gold® (LRG – résine perméable aux anticorps) diluée dans de l'éthanol 90 %. Les bains successifs de concentrations croissantes de 50 %, 70 %, 90 % et 100% sont suivis de deux autres auxquels sont ajoutés 0.5 % de benzyl (catalyseur de la polymérisation). Chaque incubation dure 1 heure à -20°C exceptée la dernière qui est réalisée durant au moins 12 h. Les AMG sont ensuite inclus dans des gélules de gélatine remplies de résine et mis à polymériser sous UV durant une nuit à -20°C.

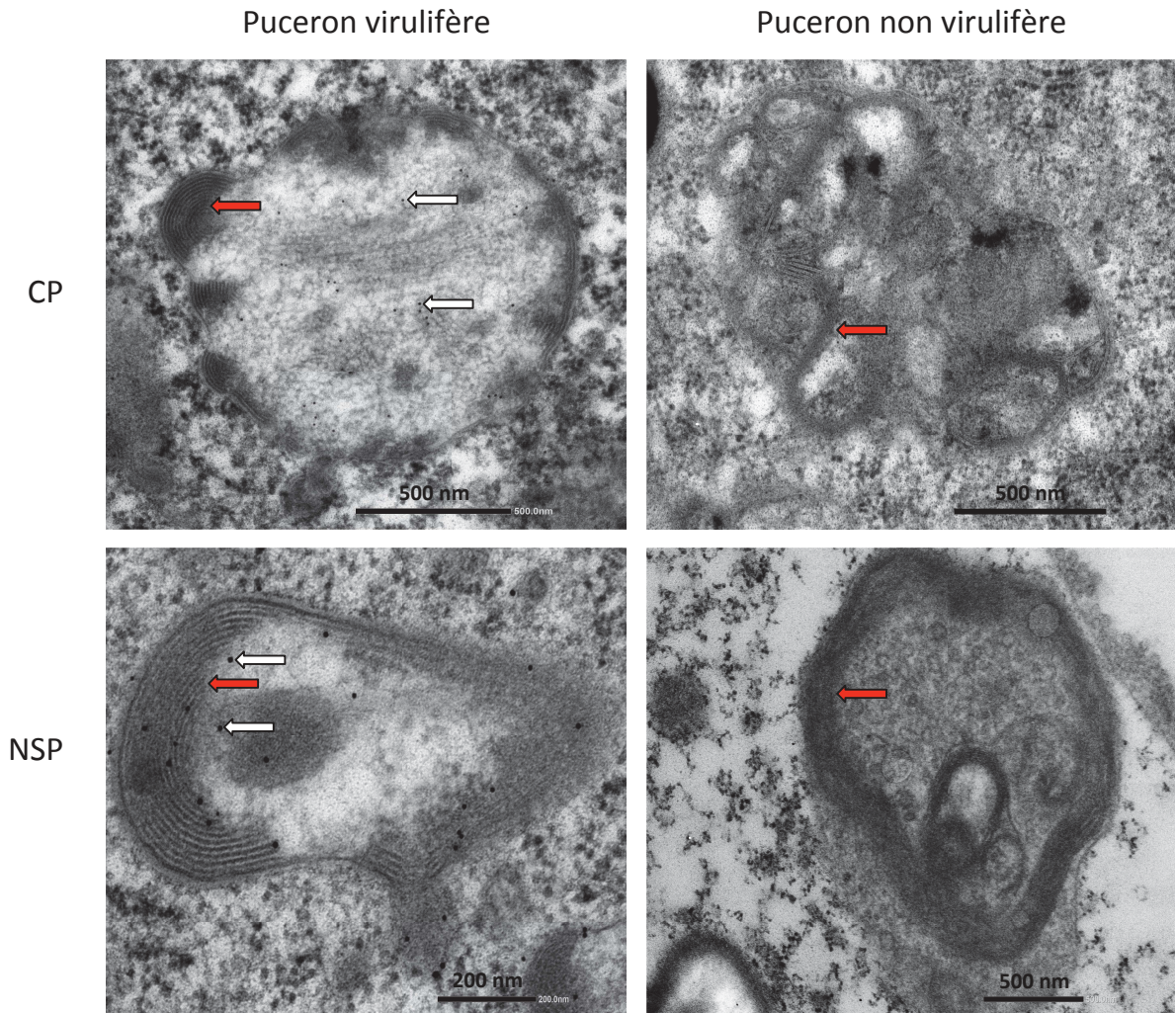


Figure 6. Immunolocalisation des protéines CP et NSP par microscopie électronique à transmission dans des intestins d'*A.pisum* virulifères et non virulifères.

Les flèches rouges indiquent les structures de corps multilamellaires. Les flèches blanches correspondent aux zones d'accrochage des Ac visualisables grâce aux billes d'or.

Après complète polymérisation, des coupes fines de 80 nm d'épaisseurs sont réalisées à l'aide d'un couteau de diamant par ultra-microtomie (ultramicrotome DIATOME). Les coupes sont récupérées sur des grilles de microscopie électronique de 50 mesh en cuivre.

On peut ensuite procéder à l'étape d'immunomarquage proprement dite dont le protocole présente de grandes similarités avec celui utilisé en microscopie confocale. Tout d'abord, une étape de saturation des sites aspécifiques est faite en plaçant les grilles, et donc les coupes fines, sur une goutte de 20 µL de solution de blocage (0.1 M Tris HCl, 0.85 % NaCl, 0.1 % tween 20 et 1 % BSA) pendant 30 minutes à température ambiante. Les grilles sont ensuite séchées sur du papier Whatman avant d'être déposées sur une goutte de 20 µL de solution de rinçage (0.1 M Tris HCl, 0.85 % NaCl, 0.1 % tween 20 et 0.1 % BSA) comportant l'anticorps primaire dilué à 1/100 pendant une nuit à 4°C (les anticorps anti-CP et -NSP sont les mêmes que ceux décrits dans la publication **Di Mattia et al. (2020)** de ce chapitre). Le lendemain, les grilles sont rincées 3 fois durant 1 minute par passage successif dans des gouttes de solution de rinçage, puis mises à incuber 1 h à température ambiante dans la solution de rinçage contenant l'anticorps secondaire anti-souris dilué au 1/25ème (BBI EMGMHL 10) couplé à des billes d'or de 10 nm de diamètre. Pour éliminer le surplus d'anticorps, six rinçages sont effectués: 3 dans la solution de rinçage précédente puis 3 dans de l'eau distillée (afin d'éliminer les éventuels sels de la solution de rinçage). Les grilles sont enfin séchées sur du papier Whatman puis contrastées à l'acétate d'uranyle 5 % pendant 20 min puis au citrate de plomb 0.3 % pendant 3 min. Chaque solution de contrastant est diluée dans de l'eau distillée. Après chaque incubation, un lavage est effectué dans de l'eau distillée. Les solutions d'acétate d'uranyle et de citrate de plomb vont permettre d'améliorer le contraste entre les différents organites cellulaires grâce aux atomes lourds que contiennent ces solutions. Les échantillons sont ensuite observés au microscope électronique (JEOL JEM1400).

Résultats et discussions

Les observations des cellules de l'AMG des pucerons virulifères ont montré la présence en grand nombre de corps cytoplasmiques non identifiés comportant des zones multilamellaires (**Figure 6, flèches rouges**). Des structures présentant de grandes similitudes sont aussi observées chez les pucerons non virulifères. Ces observations ne permettent donc pas d'exclure la possibilité que le virus puisse s'accumuler dans des structures déjà présentes naturellement dans les cellules de l'AMG du vecteur. La principale différence entre les corps cytoplasmiques observés chez les pucerons virulifères et non virulifères réside en la localisation des enroulements lamellaires.

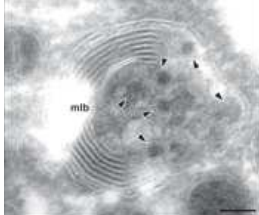
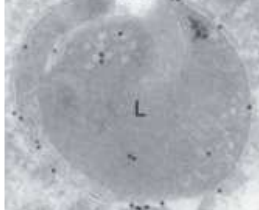
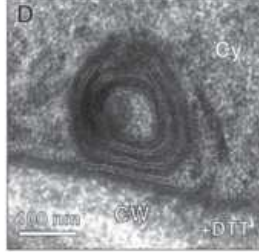
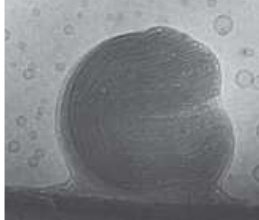
S'ils sont situés préférentiellement en périphérie de (voire accolés à) la membrane de la structure identifiée chez les pucerons infectés, ils sont présents de manière plus dispersée chez les pucerons sains.

L'immunomarquage à l'aide d'anticorps primaires ciblant les protéines NSP ou CP, associé à l'utilisation d'anticorps secondaires couplés à des billes d'or a permis de démontrer que les protéines virales, et donc à priori les particules virales, se localisent dans ces structures (**Figure 6, flèches blanches**). Cependant, aucune particule virale de nanovirus n'a encore été observée dans son vecteur sans qu'une explication puisse être donnée quant à cette absence de visualisation. Il est toutefois à noter qu'il en est de même pour les virus du genre *Geminivirus*. Seuls **Ammar et al. (2009)** ont observé, pour le Maize streak virus (MSV, *Geminiviridae*) non pas des particules virales, mais une accumulation de particules visualisables sous la forme de réseaux paracrystallins dans des cellules intestinales de l'insecte vecteur (taille des structures paracrystallines : 200 – 1 300 nm de diamètre). Dans le cas du FBNSV, l'observation de purifications virales à partir de plantes infectées a montré la présence de très nombreuses particules virales icosaédriques d'une taille comprise entre 18 et 20 nm. Le fait que ces particules ne puissent être retrouvées lors de l'observation en MET des coupes d'AMG d'*A. pisum* interroge sur la forme sous laquelle le virus transite dans le puceron.

Afin d'étudier la nature de ces structures multilamellaires, des études complémentaires ont été réalisées en microscopie confocale à l'aide d'anticorps dirigés contre des protéines spécifiques de vésicules d'entocytose (endosomes précoce ou tardif), d'organites (Golgi, RE, Mitochondrie). Ces travaux, encore en cours, sont présentés dans le chapitre 4 de ma thèse.

À ce stade, les résultats obtenus par immunolocalisation ne permettent pas de conclure sur l'origine et/ou l'identité précise de ces structures. Nous avons établi une liste non exhaustive des structures déjà observées en MET chez d'autres organismes présentant une membrane multilamellaires semblable à ce que Marie-Stéphanie Vernerey a observé (**Tableau 1**). Ces structures sont presque toutes liées à la voie de dégradation cellulaire (Endosome tardif, lysosome et autophagosome) (**Zila et al. 2014; Klumperman et Raposo 2014; Schuck, Gallagher, et Walter 2014**). Il est à noter que le corps multilamellaire est décrit comme l'un des marqueurs des endosomes tardifs (**Piper et Luzio 2001**). L'accumulation de membranes commence au stade de l'endosome précoce qui lors de sa maturation en endosome tardif va voir se s'accroître le nombre de ces couches membranaires superposées (**Piper et Luzio 2001**).

Tableau 1. Liste et photos non exhaustives de vésicules multimembranaires présentant des similitudes avec les structures observées dans la figure 6.

Structure/organite	MET	légende	organisme	références
Late endosome		mlb : Multilamellar body	<i>Mus musculus</i>	(Zila et al. 2014)
Lysosome		L : Lysosome	<i>Homo sapiens</i> – Lignée cellulaire de cancer du foie humain	(Klumperman et Raposo 2014)
Réticulum endoplasmique : induction de l'autophagie		Cy : cytoplasme CW : cell wall	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(Schuck, Gallagher, et Walter 2014)
Interaction entre liposome et ADN		NA	<i>In vitro</i>	(Gustafsson et al. 1995)

Chez les mammifères, le Mouse polyomavirus (MPyV) a été localisé dans des endosomes tardifs présentant cette accumulation de membranes (**Tableau 1 - Zila et al. 2014**). Chez les pucerons, des virions du *Beet western yellows virus* (BWYV - famille *Luteoviridae*) ont été localisés dans des structures multilamellaires pouvant être apparentées à des vésicules endocytaires (**Brault, Herrbach, et Reinbold 2007**).

Les endosomes tardifs mûrissent à leur tour en lysosomes où des multicouches membranaires peuvent être retrouvées (**Klumperman et Raposo 2014**). Ils peuvent également fusionner avec des autophagosomes, entraînant la formation de vésicules comportant de multiples couches membranaires (**Morishita et al. 2020**). L'interaction entre ADN et lipides peut entraîner la formation de liposomes dont l'image présentée dans le tableau 1 montre une forme proche de ce qui a été observé par Marie Stéphanie Vernerey. De ce fait, il est primordial de vérifier si le virus transite dans ces structures sous forme de virion mature ou sous forme d'ADN associé à des protéines de capsid.

7. Conclusions et discussions

Comme le babuvirus BBTv, le nanovirus FBNSV s'accumule dans l'AMG et les PSG. Ce résultat montre que, dans les pucerons vecteurs, l'ensemble des nanovirus semble coloniser les mêmes organes que les geminivirus du genre *Capulavirus* (transmis par pucerons). Par contre, la localisation semble différente de celle décrite pour les lutéovirus, eux aussi transmis par pucerons sur le mode circulant non-multipliant, qui s'accumulent dans l'intestin postérieur et glandes salivaires accessoires.

L'absence de localisation du virus dans le noyau des cellules de l'AMG et des PSG est un argument confortant l'idée que le FBNSV ne se multiplie pas (ou en tout cas, pas massivement) dans son vecteur. Une telle conclusion impliquerait que le changement des fréquences relatives des différents segments viraux qui intervient lors du passage de la plante au vecteur (**Sicard et al. 2015**) ne résulte pas d'une réplication virale. Cependant, dans nos conditions expérimentales, probablement pour une question de sensibilité, nous n'avons pu détecter le virus par FISH qu'après un temps d'acquisition supérieur à 10 jours et ne pouvons par conséquent pas exclure qu'il existe une phase précoce de réplication. Nous ne pouvons pas non plus exclure qu'une très faible quantité d'ADN non détectable soit localisée dans le noyau même au temps tardif d'acquisition. Il est important dans des travaux futurs de confirmer l'absence de réplication, voire même de transcriptions virales dans les cellules de l'AMG ou des PSG. Pour cela, la recherche d'ADN non encapsidé ou dsDNA dans les cellules du vecteurs amènerais de premiers éléments de réponse.

Les localisations des segments du FBNSV par paires ont permis de démontrer qu'ils co-localisent probablement tous dans les mêmes cellules du vecteur. Malgré une vie multicellulaire dans la plante (**Sicard et al. 2019**), les 8 segments s'accumulent ensemble dans l'AMG et les PSG du vecteur ce qui permet de fortement réduire la possibilité de perdre un segment durant la transmission d'une plante à une autre. La parfaite co-localisation de la protéine de capsid et de l'ADN viral indique que les segments génomiques transitent dans les cellules du puceron associés à la CP, très probablement sous forme encapsidée, bien que ce dernier point n'ait pas encore été formellement démontré. Des travaux complémentaires pourront être réalisés pour confirmer que la forme qui transite est bien la particule virale mature.

Nos travaux ont enfin permis de préciser le rôle de la NSP. L'absence de détection de l'ADN viral dans l'AMG du vecteur lorsque la NSP n'est pas présente, ou lorsqu'elle est mutée (ajout de 6-His en N- ou C-terminal), confirme sa fonction de facteur assistant de la transmission proposée précédemment (**Franz et al. 1999; Grigoras et al. 2018**) et précise son action dans l'entrée et/ou accumulation du virus dans ces cellules. Comme pour la CP, la co-localisation de la NSP et de l'ADN viral dans les cellules de l'AMG semble indiquer que cette protéine est associée au virus, au moins au niveau de l'AMG.

Enfin, les travaux de microscopies électroniques ont permis de nous aiguiller vers la compréhension de la voie intracellulaire empruntée par le FBNSV dans son insecte vecteur. Pour approfondir les connaissances dans ce sens, il sera important pour la suite d'identifier avec des marqueurs appropriés les vésicules qui contiennent le matériel viral dans AMG et PSG et ceci en fluo et MET. Associée à cette identification, il faudra compléter la description de la voie de transcytose (entrée, stockage, sortie) qu'empreinte le FBNSV (**cf. Chapitre 4**).

8. Références hors article

- Ammar el, D., D. Gargani, J. M. Lett, et M. Peterschmitt. 2009. « Large Accumulations of Maize Streak Virus in the Filter Chamber and Midgut Cells of the Leafhopper Vector *Cicadulina Mbila* ». *Arch Virol* 154(2):255-62.
- Boulain, Hélène. 2017. « Diversité, caractéristiques évolutives et rôles des effecteurs salivaires du puceron du pois dans l'interaction avec ses plantes hôtes ». These de doctorat, Rennes, Agrocampus Ouest.
- Brault, V., E. Herrbach, et C. Reinbold. 2007. « Electron Microscopy Studies on Luteovirid Transmission by Aphids ». *Micron* 38(3):302-12.
- Bressan, A., et S. Watanabe. 2011. « Immunofluorescence Localisation of Banana Bunchy Top Virus (Family Nanoviridae) within the Aphid Vector, *Pentalonia nigronervosa*,

- Suggests a Virus Tropism Distinct from Aphid-Transmitted Luteoviruses ». *Virus Res* 155(2):520–25.
- Di Mattia, J., M. S. Vernerey, M. Yvon, E. Piroilles, M. Villegas, Y. Gaafar, H. Ziebell, Y. Michalakis, J. L. Zeddám, et S. Blanc. 2020. « Route of a Multipartite Nanovirus across the Body of Its Aphid Vector ». *Journal of Virology* 94(9). doi: 10.1128/JVI.01998-19.
- Franz, A. W., F. van der Wilk, M. Verbeek, A. M. Dullemans, et J. F. van den Heuvel. 1999. « Faba Bean Necrotic Yellowing Virus (Genus Nanovirus) Requires a Helper Factor for Its Aphid Transmission ». *Virology* 262(1):210–19.
- Grigoras, I., H. J. Vetten, U. Commandeur, H. Ziebell, B. Gronenborn, et T. Timchenko. 2018. « Nanovirus DNA-N Encodes a Protein Mandatory for Aphid Transmission ». *Virology* 522:281–91. doi: 10.1016/j.virol.2018.07.001.
- Gustafsson, J., G. Arvidson, G. Karlsson, et M. Almgren. 1995. « Complexes between Cationic Liposomes and DNA Visualized by Cryo-TEM ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1235(2):305–12. doi: 10.1016/0005-2736(95)80018-B.
- Klumperman, J., et G. Raposo. 2014. « The Complex Ultrastructure of the Endolysosomal System ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6(10). doi: 10.1101/cshperspect.a016857.
- Morishita, H., Y. Kanda, T. Kaizuka, H. Chino, K. Nakao, Y. Miki, Y. Taketomi, J. L. Guan, M. Murakami, A. Aiba, et N. Mizushima. 2020. « Autophagy Is Required for Maturation of Surfactant-Containing Lamellar Bodies in the Lung and Swim Bladder ». *Cell Reports* 33(10):108477. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108477.
- Mutti, N. S., J. Louis, L. K. Pappan, K. Pappan, K. Begum, M. S. Chen, Y. Park, N. Dittmer, J. Marshall, J. C. Reese, et G. R. Reeck. 2008. « A Protein from the Salivary Glands of the Pea Aphid, *Acyrtosiphon pisum*, Is Essential in Feeding on a Host Plant ». *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(29):9965–69.
- Piper, Robert C., et J. Paul Luzio. 2001. « Late Endosomes: Sorting and Partitioning in Multivesicular Bodies ». *Traffic* 2(9):612–21. doi: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.20904.x>.
- Ponsen, M. B. 1972. « The site of potato leafroll virus multiplication in its vector, *Myzus persicae*: an anatomical study. » *Meded. Landbouwhogeschool Wageningen* 72(16):1–147.
- Schuck, S., C. M. Gallagher, et P. Walter. 2014. « ER-phagy mediates selective degradation of endoplasmic reticulum independently of the core autophagy machinery ». *Journal of Cell Science* 127(18):4078–88. doi: 10.1242/jcs.154716.
- Sicard, A., E. Piroilles, R. Gallet, M. S. Vernerey, M. Yvon, C. Urbino, M. Peterschmitt, S. Gutiérrez, Y. Michalakis, et S. Blanc. 2019. « A multicellular way of life for a multipartite virus » édité par F. García-Arenal, D. Weigel, et F. García-Arenal. *eLife* 8:e43599. doi: 10.7554/eLife.43599.
- Sicard, A., J. L. Zeddám, M. Yvon, Y. Michalakis, S. Gutiérrez, et S. Blanc. 2015. « Circulative Nonpropagative Aphid Transmission of Nanoviruses: an Oversimplified View ». *Journal of Virology* 89(19):9719–26. doi: 10.1128/JVI.00780-15.
- Wang, W., H. Dai, Y. Zhang, R. Chandrasekar, L. Luo, Y. Hiromasa, C. Sheng, G. Peng, S. Chen, J. M. Tomich, Reese, J. O. Edwards, Le Kang, G. Reeck, et F. Cui. 2015. « Armet Is an Effector Protein Mediating Aphid-Plant Interactions ». *The FASEB Journal* 29(5):2032–45. doi: <https://doi.org/10.1096/fj.14-266023>.

- Watanabe, S., et A. Bressan. 2013. « Tropism, Compartmentalization and Retention of Banana Bunchy Top Virus (Nanoviridae) in the Aphid Vector *Pentalonia nigronervosa* ». *J Gen Virol* 94(Pt 1):209-19.
- Watanabe, S., D. Borthakur, et A. Bressan. 2016. « Localization of Banana Bunchy Top Virus and Cellular Compartments in Gut and Salivary Gland Tissues of the Aphid Vector *Pentalonia nigronervosa* ». *Insect Science* 23(4):591-602. doi: 10.1111/1744-7917.12211.
- Zila, V., F. Difato, L. Klimova, S. Huerfano, et J. Forstova. 2014. « Involvement of Microtubular Network and Its Motors in Productive Endocytic Trafficking of Mouse Polyomavirus ». *PLOS ONE* 9(5):e96922. doi: 10.1371/journal.pone.0096922.

**CHAPITRE 2 : LA CO-ACQUISITION D'UN
NANOVIRUS ET D'UN GEMINIVIRUS MONTRE
UNE LOCALISATION DIFFERENTE DANS
LEUR PUCERON VECTEUR COMMUN.**

1. Mise en contexte et résumé

NB/ les numéros des figures cités ci-dessous sont ceux de l'article

Cette publication porte sur l'étude de la co-transmission de l'*Alfalfa leaf curl virus* (ALCV, famille *Geminiviridae*, genre *Capulavirus*) et du *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV, famille *Nanoviridae*, genre *Nanovirus*) par leur puceron vecteur commun, *Aphis craccivora*.

Geminiviridae et *Nanoviridae* sont deux familles apparentées de virus à ADN simple brin circulaire inféodées aux plantes. Les espèces membres de ces deux familles virales sont toutes transmises par des insectes hémiptères. Les geminivirus présentent une large gamme de vecteurs (cicadelles, membracides, mouches blanches et pucerons), alors que les nanovirus sont uniquement transmis par pucerons (à une exception près qui reste à confirmer, (**Gronenborn et al. 2018**)). Hormis la controverse sur les espèces proches du TYLCV déjà discutée dans l'introduction, ces deux groupes de virus sont transmis suivant le mode circulant non multipliant et les études disponibles semblent indiquer une localisation identique dans AMG et PSG quelle que soit l'espèce vectrice.

Du fait de la proximité phylogénétique de ces deux familles, il est en fait très commun de les comparer pour la transmission et pour les autres fonctions du cycle viral, et d'étendre les découvertes faite sur les geminivirus aux nanovirus souvent sans réelle vérification expérimentale. La découverte récente de la transmission par pucerons de geminivirus appartenant au genre *Capulavirus* (**Roumagnac et al. 2015**) nous offre la possibilité de réellement comparer les modalités de la transmission chez gemini- et nanovirus puisque l'on connaît maintenant des espèces de chacun des 2 groupes infectant la même plante hôte et transmises par un même puceron vecteur.

Durant sa thèse dans notre laboratoire, Faustine Ryckebusch a étudié la transmission de l'ALCV (capulavirus) qui peut infecter la fève *Vicia faba* et être transmis par le puceron *Aphis craccivora* (**Ryckebusch et al. 2020**), tout comme le FBNSV. Nous avons donc initié une étroite collaboration pour étudier le comportement de ces deux virus lors de leur co-infection dans la plante, et surtout durant leur co-transmission par le vecteur (comprenant les étapes d'acquisition, d'accumulation et d'inoculation). Ces travaux ont fait l'objet de la publication qui constitue ce chapitre 2.

En résumé, nous avons tout d'abord mis en évidence que l'ALCV et le FBNSV s'accumulent de manière identique dans la plante hôte qu'ils soient seuls ou en co-infection, indiquant une absence d'interférence entre les deux virus in planta.

L'observation des tissus infectés, par FISH spécifique de chaque virus et microscopie confocale, a permis de confirmer que la co-infection est non seulement possible dans la plante entière, mais aussi au niveau des cellules individuelles, où les deux virus s'accumulent de façon indépendante (**Figure 1**). Les deux virus sont relargués dans et transportés par la sève phloémienne où le puceron se nourrit et les prélève de manière concomitante. Nous avons étudié cette co-acquisition en observant dans un premier temps l'accumulation des génomes viraux dans les organes et tissus du vecteur *A. craccivora*. Pour chaque expérience, une comparaison a été menée en parallèle sur des pucerons n'ayant acquis que l'un des deux virus. La quantification des ADN viraux par qPCR dans l'abdomen et la tête indique que l'accumulation, et par extension la circulation, d'un virus n'est pas qualitativement affectée par celle de l'autre. L'ALCV semble toutefois avoir un léger effet négatif sur l'accumulation du FBNSV (**Figure 2**). Suite à ces résultats, nous avons marqué les deux virus par FISH dans l'intestin du vecteur. Comme témoins positifs de co-localisation, nous avons choisi de marquer deux segments distincts du FBNSV (U2 et U4) (**Figure 3D**). Comme nous l'avons publié précédemment (**Di Mattia et al. 2020; Ryckebusch et al. 2020**) les deux virus s'accumulent dans les cellules de l'AMG et des PSG. Ce qui s'avère particulièrement intéressant, c'est qu'au niveau intracellulaire, le marquage des deux segments du FBNSV montre une parfaite co-localisation (comme décrit dans l'article du Chapitre 1), alors que celui des deux virus co-acquis révèle une localisation totalement distincte (**Figure 3C et D**). Ce résultat suggère pour la première fois que gémivirus et nanovirus utilisent des voies de transport transcellulaires différentes et donc possiblement des récepteurs différents.

Nous avons ensuite quantifié l'inoculation de ces virus en utilisant des disques foliaires de fève. Les pucerons sont placés par lots de 10 sur les disques foliaires pour une IAP (inoculation access period) de 24 ou 48 h (**Table 1**). On recherche ensuite les virus qui ont été inoculés par qPCR, ou nested-PCR pour plus de sensibilité. Aucune différence n'est observée entre l'inoculation du FBNSV ou de l'ALCV suivant qu'il soit acquis et transmis à partir de plante mono- ou co-infectées. Ce résultat indique qu'il n'y a pas d'interférence majeure détectable entre ces deux virus durant la totalité du cycle au travers du puceron vecteur.

Pour terminer, nous avons observé le développement de l'infection dans les plantes hôtes lorsque les deux virus étaient co-inoculés par des pucerons. Il est apparu que le FBNSV infecte beaucoup plus fréquemment que l'ALCV (**Table 2**). En effet, lors de ces 5 expériences de co-transmission, le FBNSV est passé en systémie quasiment à chaque fois, alors que l'ALCV n'a réussi à le faire que sur deux plantes. Il faut souligner que ces

deux plantes n'étaient pas infectées par le FBNSV, suggérant un avantage compétitif du FBNSV dans les étapes précoces de l'infection, qui pourrait le plus souvent éliminer l'ALCV, ce dernier ne réussissant à coloniser la plante que quand le FBNSV est absent à ce stade.

2. Article : Co-Acquired Nanovirus and Geminivirus Exhibit a Contrasted Localization within Their Common Aphid Vector (publié dans Viruses)

Co - Acquired Nanovirus and Geminivirus Exhibit a Contrasted Localization within Their Common Aphid Vector

Jérémy Di Mattia ^{1,†}, Faustine Ryckebusch ^{1,†}, Marie-Stéphanie Vernerey ¹, Elodie Piroilles ¹, Nicolas Sauvion ¹, Michel Peterschmitt ¹, Jean-Louis Zeddam ^{1,2} and Stéphane Blanc ^{1,*}

¹ UMR BGPI, Univ. Montpellier, INRAE, CIRAD, Montpellier SupAgro, 34398 Montpellier, France; jeremydimattia@gmail.com (J.D.M.); faustine.ryckebusch@cirad.fr (F.R.); marie-stephanie.vernerey@inra.fr (M.-S.V.); elodie.piroilles@inra.fr (E.P.); nicolas.sauvion@inra.fr (N.S.); michel.peterschmitt@cirad.fr (M.P.); Jean-Louis.Zeddam@ird.fr (J.-L.Z.)

² UMR IPME, Univ. Montpellier, IRD, CIRAD, 34398 Montpellier, France

* Correspondence: stephane.blanc@inrae.fr

† These authors contributed equally to this work.

Received: 16 January 2020; Accepted: 22 February 2020; Published: 10 March 2020

Abstract: Single-stranded DNA (ssDNA) plant viruses belong to the families *Geminiviridae* and *Nanoviridae*. They are transmitted by Hemipteran insects in a circulative, mostly non-propagative, manner. While geminiviruses are transmitted by leafhoppers, treehoppers, whiteflies and aphids, nanoviruses are transmitted exclusively by aphids. Circulative transmission involves complex virus–vector interactions in which epithelial cells have to be crossed and defense mechanisms counteracted. Vector taxa are considered a relevant taxonomic criterion for virus classification, indicating that viruses can evolve specific interactions with their vectors. Thus, we predicted that, although nanoviruses and geminiviruses represent related viral families, they have evolved distinct interactions with their vector. This prediction is also supported by the non-structural Nuclear Shuttle Protein (NSP) that is involved in vector transmission in nanoviruses but has no similar function in geminiviruses. Thanks to the recent discovery of aphid-transmitted geminiviruses, this prediction could be tested for the geminivirus alfalfa leaf curl virus (ALCV) and the nanovirus faba bean necrotic stunt virus (FBNSV) in their common vector, *Aphis craccivora*. Estimations of viral load in midgut and head of aphids, precise localization of viral DNA in cells of insect vectors and host plants, and virus transmission tests revealed that the pathway of the two viruses across the body of their common vector differs both quantitatively and qualitatively.

Keywords: fluorescent in situ hybridization; qPCR; leaf discs; Hemiptera; nanovirus; geminivirus; vector transmission

Introduction

All ssDNA plant viruses belong to the families *Geminiviridae* and *Nanoviridae* and are transmitted by hemipteran vectors in a circulative, mostly non-propagative, manner [1,2], meaning that they persist and cycle within the body of their vectors without replication [3,4]. While nanoviruses are transmitted exclusively by insects of the family *Aphididae* (aphids) [5], geminiviruses are transmitted by three other hemipteran families: *Cicadellidae* (leafhoppers), *Membracidae* (treehoppers) and *Aleyrodidae* (whiteflies) [6–8]. Circulative transmission involves sophisticated virus–vector interactions in which viruses can cross insect epithelial membranes and escape intracellular degradation pathways and other insect immune defense mechanisms [9]. The fact that vector specificity can be used as a discriminating criterion for taxonomic assignment, particularly in the family *Geminiviridae* [10], reveals that vectors can structure virus populations via transmission

specialization. While geminivirus-associated diseases have been studied for more than 100 years, a new genus had to be created recently in the family *Geminiviridae* (the genus *Capulavirus*) to accommodate the newly discovered aphid-transmitted species [11]. Alfalfa leaf curl virus was the first geminivirus for which aphid transmission was demonstrated, and its transmission by *Aphis craccivora* (Koch, 1854) was shown to be highly specific [12]. Unexpectedly, the transmission rate of ALCV per individual aphid was much lower than that of whitefly- and leafhopper-transmitted geminiviruses [13]. While ALCV was acquired and stably retained in midguts, the viral content in heads was relatively low and decreased over time, suggesting a low viral flow from the aphid body into the saliva [13]. Considering the late discovery of this genus, which may reflect a slow dissemination to, and within, cultivated hosts, these authors discussed the intriguing hypothesis that geminiviruses may not readily evolve virus–vector interactions that lead to high transmission efficiencies in aphids. From that, it is tempting to speculate that nanoviruses, which are all transmitted by aphids, have evolved virus–vector interactions that differ from those evolved by capulaviruses. In this case, different transmission routes, as well as different transmission rates, may be expected.

Nanoviruses and most geminiviruses are reported to be restricted to phloem tissues of their host plants [14], and species of both groups have been detected in the anterior midgut (AMG) and principal salivary glands (PSG) of their aphid vector [12,15–17]. Despite these similarities, striking differences also exist, and can be expected to have a significant impact on transmission. While the genome of capulaviruses consists of only one ssDNA circle, that of nanoviruses has a multipartite organization and consists of eight ssDNA circles, each encapsidated individually in a distinct virus particle. Moreover, while the CP is the only geminivirus protein reported to interact with insect vectors [18,19], the NSP of nanoviruses has been shown to act as a helper factor for transmission [20,21] and is mandatory for accumulation of virus particles within the cells of the aphid AMG [22]. Thus, the different genome architecture, and the use of a helper factor for the transmission of nanoviruses but not of geminiviruses, is consistent with potentially different adaptations to vectors in these two viral families.

Here, we explore this prediction by making use of the fact that the ALCV (capulavirus) and the FBNSV (nanovirus) both share a common host (broad bean) and a common aphid vector (*Aphis craccivora*). Our results show that the ALCV- and FBNSV-vector interactions are different based on several features. First, DNA accumulation of ALCV in the midgut is about 10 times higher than that of FBNSV. Second, in situations of co-infection, although ALCV has an apparent negative impact on FBNSV accumulation in aphids, the transmission rate of the latter remains 2–10 times higher than that of the former. Third, in spite of higher accumulation in aphids, ALCV is excreted in the saliva in much lower amounts than FBNSV. Finally, while both viruses accumulate in the same cells in the aphid AMG, they do not co-localize within these cells, suggesting that they use distinct pathways during transcytosis.

Materials and Methods

1.1. Plant Material and Agro-Inoculation

Broad bean plants (*Vicia faba*, L. cv. "Séville", Vilmorin, Paris, France) were maintained in growth chambers with 70% hygrometry, 26/20°C day/night temperature and 13/11 h day/night photoperiod. The soil of each potted plant was sprayed with a 0.04% aqueous solution of Trigard 75 WP (ref: 24923, Syngenta®, Syngenta Global, Basel, Switzerland) to prevent development of sciarid flies.

The FBNSV agroinfectious clone was constructed earlier from an Ethiopian isolate [23]. It consists of eight distinct clones, each containing one of the eight FBNSV genome segments (C, M, N, R, S, U1, U2, U4) inserted as a head-to-tail dimer into the binary plasmid pBin19. Each of these eight plasmids were propagated into the COR308 strain of *Agrobacterium tumefaciens* and inoculated into plants as a mixture exactly as earlier described [24]. The agroinfectious clone of ALCV has also been previously described [11]. It consists of a tandem repeat of the whole genome sequence, inserted in the binary plasmid pCambia2300 and transformed in the C58 strain of *A. tumefaciens*, which can be

inoculated into plants as a single agrobacterial culture [12]. FBNSV and ALCV clones were used to agroinoculate 10-day-old plantlets. The OD₆₀₀ of agrobacteria cultures was monitored in order to inoculate the same amount (OD₆₀₀ between 2 and 3 units) of cells for each clone in all experiments. This resulted in a number of bacterial cells being infiltrated into the plant, equal to 1' for mono-infection with ALCV, to 8' for mono-infection with FBNSV, to 9X for co-infection with both viruses. In one test (as indicated in the Results), FBNSV was inoculated by viruliferous aphids with an inoculation access period (IAP) of 2 days on 8-day-old plantlets, prior to agro-inoculation with ALCV. Mono-infected or co-infected plants were all analyzed by qPCR (see below) to confirm the presence of ALCV and of each of the eight components of FBNSV.

1.2. Aphid Rearing

Individuals of *A. craccivora* came from a clonal colony established previously [13], and were reared on healthy broad bean plants maintained under a 24/18°C day/night temperature and a 16/8 h day/night photoperiod. Viruliferous aphid cohorts were derived from this colony by placing apterous adult females on broad bean plants infected for approx. 30 days with FBNSV, ALCV or both. For transmission tests, these apterous females were transferred onto healthy plantlets after a 3-day acquisition access period (AAP). For in situ hybridization, the apterous females were removed following the 3-day AAP, and their larvae were left to develop on the infected plants for a further 10 days. This procedure yielded young viruliferous adults that had been in contact with the virus(es) for a longer period, i) allowing abundant virus accumulation in the gut and salivary glands, and ii) increasing the likelihood of observing the association of viruses with intracellular compartments in a form in which they are durably stored.

1.3. Plant and Insect Dissections

Veins from the upper leaves of infected plants were collected with an adhesive tape following a published protocol [25]. The veins were then fixed overnight at 4°C under gentle stirring in embryo dishes containing 4% paraformaldehyde (PFA) and 0.2% Triton X-100 diluted in phosphate-buffered saline 1X pH 7.4 (PBS). Fixation was stopped by a 15-min incubation in 0.1 M glycine diluted in PBS followed by a washing step in PBS. To reduce chlorophyll autofluorescence, plant samples were incubated five times for 30 min each in a Carnoy solution containing 6 volumes of ethanol (EtOH), 3 volumes of chloroform and 1 volume of glacial acetic acid. This process was completed with a 1-h wash in absolute ethanol. Finally, fixed leaf veins were stored at 4°C in PBS until use.

Between 30 and 50 viruliferous aphids, maintained for 10 days on an infected plant as described above, were placed for 48 h on healthy plants in order to clear the lumen from virus containing alimentary bolus. The AMG and PSG were then dissected in PBS by pulling the head off the abdomen with forceps. Organs were fixed in 4% PFA for 20 min and rinsed in 0.1 M glycine diluted in PBS for 15 min. After fixation, AMG and PSG were stored in PBS at 4°C until use.

1.4. Fluorescent in Situ Hybridization (FISH)

Virus DNA-specific fluorescent probes were prepared by random priming with the BioPrime DNA labeling system kit (Invitrogen, Carlsbad, Calif, USA) as described [26]. Probes complementary to the ALCV CP gene incorporated Alexa Fluor 488-labeled dUTP (green), whereas those complementary to FBNSV incorporated Alexa Fluor 584-labeled dUTP (red). Probes were diluted 30 times before incubation with the samples. For FBNSV-infected plants, a mix of probes targeting the eight viral segments was used because infected cells do not necessarily contain all segments [27]. In aphids, U2- (green) and U4- (red) specific probes were used to co-localize FBNSV segments. In experiments assessing the co-localization of FBNSV and ALCV in midgut cells, only the U4-specific probe was used for FBNSV because it has previously been reported that AMG cells of viruliferous pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, always contain this (and likely all) FBNSV segments [22].

Prior to labeling, dissected insect organs or plant veins were incubated for 5 min at room temperature (RT) in 20 mM Tris-HCl hybridization buffer (pH 8) containing 0.9 M NaCl, 0.01% SDS

and 30% formamide [28]. Samples were then incubated overnight at 37°C with the diluted probes in hybridization buffer, and then rinsed 3 × 5 min at room temperature in the hybridization buffer followed by two final rinses for 10 min each in PBS.

Samples were mounted on microscope slides in Vectashield® antifade mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, Calif, USA) containing 1.5 µg·mL⁻¹ of DAPI [26]. Observations were performed with a LSM700 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) and all images were taken at a resolution of 1024 × 1024 pixels with a ×63 objective.

1.5. Viral DNA Extraction

For plants, three leaf discs of 0.6 cm diameter were squashed onto Whatman paper from the upper leaf-level of infected broad bean plants. Each Whatman paper disc was then deposited individually onto the filter of 200 µl micropipette tips and 100 µL of modified Edwards buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 25 mM EDTA, 250 mM NaCl, 0.5% SDS, 1% PVP40, 0.2% ascorbic acid) were added. For insects, groups of five heads or abdomens were ground with a plastic pestle in a 1.5 mL Eppendorf tube containing 100 µl of modified Edwards buffer (without ascorbic acid). Samples were similarly deposited onto the filter of 200 µL tips, and the homogenate was centrifuged directly into a PCR plate placed underneath, at 5000 g for 15 s. Finally, the DNA was precipitated with isopropanol, washed once with 70% EtOH and resuspended in 50 µL of distilled water before further processing [12].

1.6. Quantitative Real-Time PCR (qPCR) Detection

ALCV and FBNSV DNAs were qPCR-detected and quantified in a LightCycler 480 thermocycler (Roche, Indianapolis, Ind, USA) using 2 µL total DNA extracts diluted 10-fold in H₂O. The LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green I kit (Roche) was used according to the manufacturer's instructions with 5 µl of the 2X qPCR Mastermix, 0.3–0.6 µM final primers (0.3 µM final for segments C, M and S of FBNSV, 0.5 µM final for the other segments of FBNSV and 0.6 µM final for ALCV), complemented with H₂O to obtain 8 µL of final mix for 2 µL of DNA sample as matrix (10 µL total). The specific primers of FBNSV and ALCV used for the qPCR were described in references [12] and [24], respectively. Forty qPCR cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 10 s and 72°C for 10 s were applied to the samples. All samples were analyzed with two technical replicates.

Post-PCR data analyses were carried out as described [29]. The accumulation of ALCV is expressed as the number of copies of monopartite viral genomes. Accumulation of FBNSV is expressed as the sum of the number of copies of the eight genome segments.

1.7. Transmission Experiments

Apterous adult aphids were given a 3-day AAP on infected broad bean plants followed by a 3-day IAP on 10-day-old healthy broad bean plants with 10 individual aphids per test plant. IAP was stopped with a spray of insecticide (Pirimor – Certis®, Marguerittes, France), 1 g·L⁻¹ in water). At 21 days after the beginning of the IAP, the presence of FBNSV was checked visually by inspection of symptoms, and that of ALCV by qPCR. All transmission tests were carried out in the containment room where aphid colonies are maintained, with the exception of the fifth test, which was carried out in a containment chamber with 16 h light at 26 °C, and 8 h dark at 24°C.

1.8. Leaf-Disc Inoculation Assay and Nested-PCR

Leaf-disc inoculation assays were performed to estimate the amount of viral DNA inoculated by aphids into plants. Leaf-discs of 2.5 cm diameter were maintained in 6-well cell culture plates, one disc per well, on 1.5% agarose + 2% Na₂SO₃ in PBS to limit drying and oxidation. A first experiment was performed under environmental conditions of the fifth transmission test. A second experiment was performed under the standard conditions of the aphid growth chambers. Aphids were given a 3-day AAP on infected plants and then transferred onto healthy plants for 3 days to clear the gut lumen of virus material and thus prevent surface leaf-disc contamination by viruliferous honeydew.

These “purged” aphids were transferred onto a first series of leaf-discs (10 individuals per disc) for an IAP of 24 h, and then moved to a second series of leaf discs for an additional IAP of 48 h. After aphid removal, the leaf discs were double washed in a detergent solution (Magister®, company, Epernay, France) - detergent manual plunge - 1:20 dilution in H₂O) followed by two rinses in H₂O to remove residual viral contamination by feces/honeydew. Between each wash, leaf-discs were further cleaned with a smooth paintbrush. Finally, to prepare the DNA extraction step, leaf-discs were placed in 2 mL microtubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) with two metal beads of 3 mm diameter and Fontainebleau sand. Micro-tubes containing the samples were immersed in liquid nitrogen for flash freezing and stored at -80°C if required. A volume of 750 µl of modified Edwards buffer was added in each tube where the frozen leaf discs were ground by shaking four to six times each for 20 s to obtain a homogeneous solution (FastPrep®-24, MP Biomedicals® Instrument IIIkirch-Graffenstaden, France). Total DNA was extracted using the Purelink™ plant total DNA purification kit (Invitrogen) and qPCR was carried out on 100-fold diluted samples.

For nested-PCR experiments, the extracted DNA was purified a second time with the same Purelink® Plant total DNA kit (Invitrogen), and each sample was tested in triplicate to control the presence of ALCV. The GoTaq® G2 DNA polymerase (Promega, Madison, Wis, USA) was used according to the manufacturer’s instructions, using 1 µl of the double-purified DNA, 0.25 µL polymerase, 10 µL of 5’ green GoTaq® reaction buffer, 38.25 µl H₂O, 0.5 µL dNTP and 0.5 µL of both forward and reverse primers at 10 mM. The primer pair used for the first PCR was: CP_ALCV_185-F 5’TGG AATATTGTGCTGCTTGG3’ (position 185 on the virus genome; forward orientation) and: CP_ALCV_1025-R 5’GTGGTCTATTT CAGCAGTTGC3’ (position 1025; reverse orientation). The pair of primers for the second PCR was CP_ALCV_620-F 5’GAAGAGGGCGAAAACGACAG3’ (position 620 on the genome; forward) and CP_ALCV_969-R 5’ATTTGGGACTTGTGCTCCA3’ (position 969; reverse). Each PCR was performed with 40 cycles of amplification: 98°C for 2 min, 98°C for 20 s, 58°C for 20 s, 72°C for 1 min and 72°C for 5 min.

1.9. Statistical Analysis

All statistical analyses were conducted with the package *stats* of the R software package, v3.5.0 [30]. As also indicated in the figure legends, boxplots display DNA quantification in source plants performed on $n = 9$, $n = 11$ and $n = 19$ plants infected, respectively, with FBNSV, ALCV and both viruses. Differences in the amounts of each virus DNA in abdomens and heads were tested with a Tukey HSD test on the transformed log₁₀ values. ANOVA were performed with the virus (ALCV or FBNSV), the “organ” (abdomen or head) and the type of infection (mono- or co-infection) as the tested variables.

Results

1.10. FBNSV and ALCV can Co-Infect Plants and Cells within These Plants

Both FBNSV and ALCV can individually infect broad bean [11,31]. To investigate and compare the mechanisms of their transmission, we first evaluated whether they can co-infect the same individual host plants, from which they could be concomitantly/simultaneously acquired by the insect vector. When agro-inoculated alone, the mean infection rate was 41%^(+/-33%) for FBNSV and 93%^(+/-12%) for ALCV (percent calculated from five experiments with 96 plants per experiment for FBNSV and 24 plants per experiment for ALCV). When co-agroinoculated, 9%^(+/-2%) of the plants were co-infected, while FBNSV was found in 31%^(+/-20%) and ALCV in 66%^(+/-18%) (percent calculated from five experiments with 48–72 agro-inoculated plants per experiment). This slightly lower infection rate of both FBNSV and ALCV when co-agroinoculated could stem from the trivial fact that the total amount of bacteria agro-inoculated per plant differs greatly in mono- and co-inoculation (see Materials and Methods). We did not investigate this specific point further because our primary goal was to obtain co-infected plants for further characterization. More important is the observation of identical symptoms in mono- and co-infected plants (Figure 1A) and the absence of interference between the two viruses for accumulation in plant tissues. Indeed, at 21 days post infection (dpi),

both viruses accumulated similarly in mono- and co- infections (p -value = 0.15 and 0.40 for FBNSV and ALCV, respectively), with ALCV reaching a viral load about 100 times that of FBNSV in all cases (Figure 1B).

The localization of ALCV and FBNSV was determined in co-infected plant tissues by in situ hybridization. ALCV and FBNSV DNAs were both detected in phloem vessels, most likely in companion cells, but only in some infected areas, with a large proportion of the observed cells being void of viruses. Because the two viruses appear to infect only a fraction of the susceptible cells – a phenomenon already reported for FBNSV [27] – it follows that they are often found alone (Figure 1D-E) and only occasionally together (Figure 1F).

Overall, our results demonstrate not only that FBNSV and ALCV can co-exist in the same host plant, where they accumulate as if infecting alone, but also that these viruses can co-exist in the same individual cells of these plants, suggesting little or no interference during the colonization process. Plants in which both viruses co-circulate in the sieve elements can act as source plants for concomitant virus acquisition by the aphid vector.

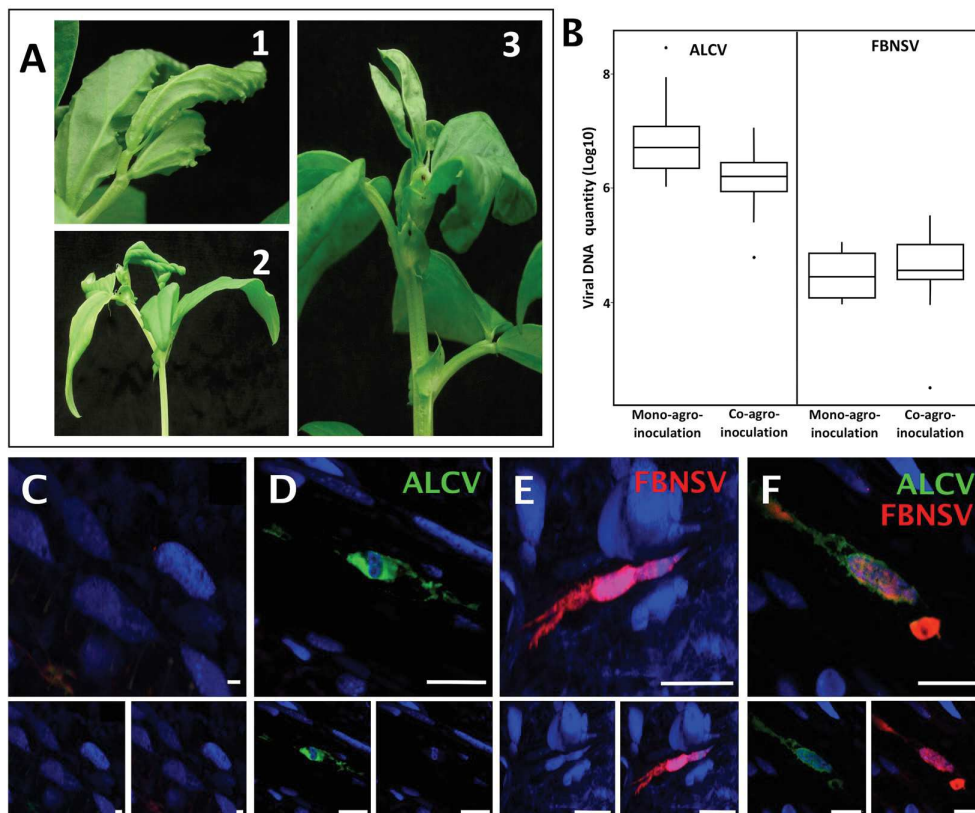


Figure 1. Localization of FBNSV and ALCV DNA in broad bean host plants.

Visualization of ALCV symptoms (A.1) and FBNSV symptoms (A.2) on late stage of infection on broad bean plants, where symptoms are easier to see, and ALCV + FBNSV symptoms (A.3) on early stage of infection, when over-curling of leaves due to FBNSV do not yet totally mask ALCV-associated vein swelling. **B:** Box-plots of viral DNA amounts (log₁₀ of the copy number, see Materials and Methods) of each virus in mono- and co-agro-inoculated broad bean plants. The box-plot on the mono- and co-infected plants represent $n = 9$ for FBNSV, $n = 11$ for ALCV and $n = 15$ for co-infected plants, respectively. **C to F:** Localization of ALCV DNA (green probe) and FBNSV DNA (8 segments labeled, red probe) in phloem tissues of broad bean plants either mock infected (**C**), or co-infected with the two viruses (**D, E and F**). Most cells contain either ALCV (**D**) or FBNSV (**E**) alone, but they can also occasionally be co-infected (**F**). Top panel in **C** to **D** are images with merged color channels and the corresponding split channels are at the bottom left (green) and right (red). Each image corresponds to maximum intensity projections. The scale bar of each image represents 25 μm . Cell nuclei are DAPI blue-stained.

1.11. FBNSV and ALCV are Co-Acquired from Co-Infected Plants

The circulative, non-propagative transmission of ALCV and FBNSV in aphids was documented recently, in independent studies, and the route of the two viruses within the vector appears strikingly similar [12,22]. Here, to test for potential interference during virus intake, we measured the viral load in aphid vectors after a 3-day AAP on mono- or co-infected plants. When acquired from mono-infected plants, ALCV accumulated in the abdomen to higher levels than FBNSV (Figure 2), likely reflecting its higher accumulation within co-infected plants (Figure 1B). Interestingly, this discrepancy was no longer observed in the heads, suggesting a lower flow of ALCV than of FBNSV between the aphid gut and salivary glands.

When acquired from co-infected plants, FBNSV and ALCV were both detected in heads and abdomens, indicating that the acquisition and transit from gut to salivary glands of one virus does not preclude that of the other (Figure 2). When considering the amounts accumulated, however, ALCV was not affected by co-infection, whereas FBNSV decreased by about one order of magnitude, both in the abdomen, and likely also in the head. This reduced accumulation of FBNSV in the presence of ALCV is discussed further below.

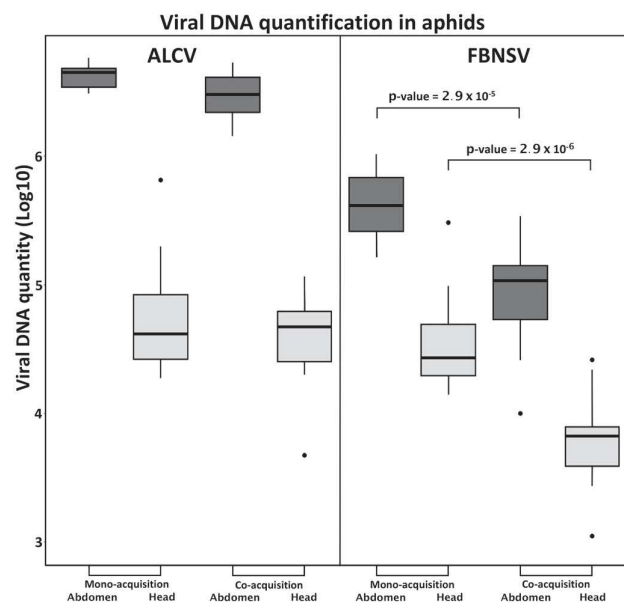


Figure 2. Accumulation of FBNSV and ALCV in aphid vectors.

The box - plots represent the amounts of viral DNA (\log_{10} of copy number) of ALCV and FBNSV in the abdomens (dark grey) and heads (light grey) of *A. craccivora*. The box - plots are from pools of five abdomens or heads with $n = 11$ for mono-infection and $n = 15$ for coinfection. p - values given result from testing the differences in FBNSV DNA amounts in heads or abdomens of aphids that have acquired FBNSV from mono - infected versus co - infected plants.

1.12. FBNSV and ALCV Accumulate in Distinct Cytoplasmic Aggregates in Aphid Gut Cells

The two viruses were localized precisely in cells of the AMG of individual aphids that fed on co-infected plants, as reported earlier for aphids fed on plants singly infected with either FBNSV [22] or ALCV [12]. Both viruses were detected in the majority of individual AMG cells, indicating that they are not mutually exclusive (Figure 3).

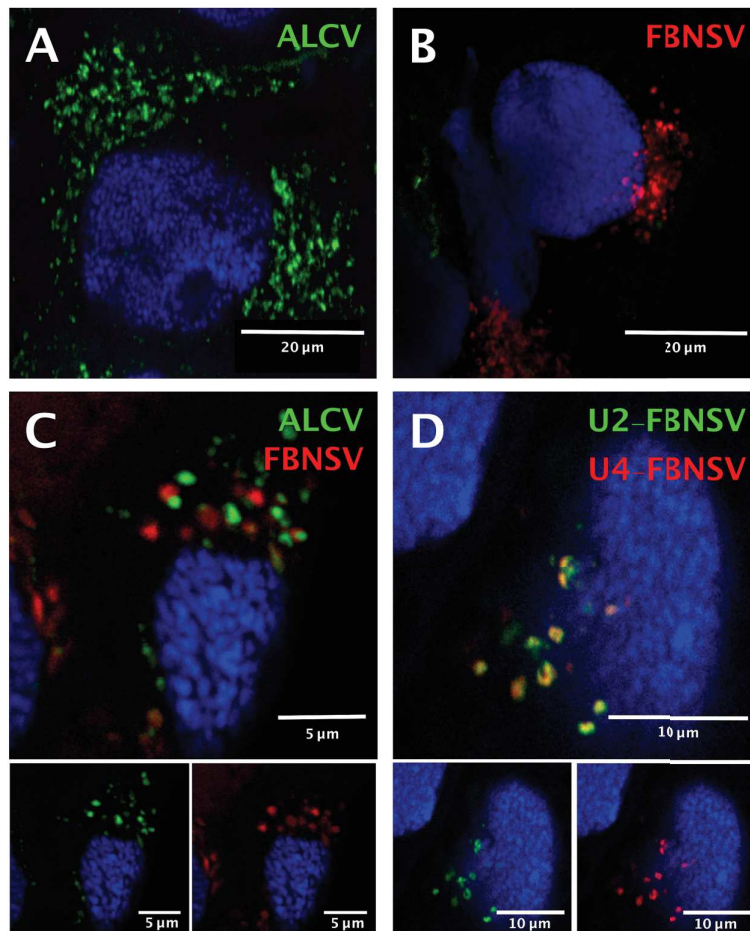


Figure 3. Localization of ALCV and FBNSV DNA in anterior midgut cells of *A. craccivora*.

Co - labeling of ALCV (green) and FBNSV (8 segments probes, red) in aphids fed on plants infected with ALCV alone (A), FBNSV alone (B), or with both viruses (C). Co - labeling of the two FBNSV segments U2 (green) and U4 (red) in aphids fed on plants co - infected by FBNSV and ALCV (D). Top panels in C and D are images with merged color channels, and the corresponding split channels are at the bottom left (green) and right (red). Images A and B correspond to maximum intensity projections and images C and D to single optical sections. Cell nuclei are blue - stained with DAPI.

Because the insects were killed and processed for FISH analysis 2 days after the end of the AAP, after a “purging” period on healthy plants, detection of the two viruses confirms that neither entry nor persistence is hindered by co-infection. The intra-cellular FBNSV and ALCV aggregates (fluorescent foci) that were detected in the same individual gut cells were similar in size and shape, and were distributed predominantly around the nucleus (Figure 3C), just as in aphids fed on singly infected plants (Figures 3A and 3B). Remarkably, each aggregate was strictly specific to either ALCV or FBNSV, and the respective fluorescent labeling never overlapped (Figure 3C).

As a control for this observation, we made use of the fact that, in aphids fed on co-infected plants, the ingested sap contains ALCV particles as well as FBNSV particles representing encapsidation of individual distinct segments. While particles of the two viral species apparently segregate upon internalization in AMG cells, particles of FBNSV containing distinct segments do not, as recently demonstrated in the aphid *A. pisum* [22]. In the same *A. craccivora* cohort as that used to localize ALCV and FBNSV simultaneously (Figure 3C), we also specifically labeled two distinct segments of FBNSV, namely U2 and U4, and confirmed that they enter cells and accumulate together (Figure 3D). This result elegantly illustrates that when the aphid vector ingests a fluid containing a mixture of virions of the two species (the sap of co-infected plants), FBNSV particles all follow the

same intracellular pathway, whatever segment they contain, and that this pathway is different from that followed by ALCV particles.

1.13. FBNSV and ALCV are Both Released Together with the Aphid Saliva

The FBNSV content of *A. craccivora* individuals fed on co-infected plants was about 10 times lower than that of those fed on mono-infected plants (Figure 2), including the heads, and thus likely the salivary glands. To test the potential effect of this lower FBNSV content on transmission, we first carried out an inoculation assay on broad bean leaf discs, as described in *Materials and Methods* section. FBNSV DNA was readily detected by qPCR after a 24-h IAP in most leaf discs previously loaded with aphids fed on mono- or co-infected plants (Table 1).

Table 1. FBNSV and ALCV DNA detection in broad bean leaf discs after aphid inoculation.

	Detection	qPCR	Nested-PCR	qPCR	Nested-PCR
		24h		48h	
Mono-inoculation	ALCV ^a	0/25	0/25	2/38	9/38
	FBNSV ^b	6/6	nt	13/14	nt
Co-inoculation	ALCV ^c	0/26	0/26	0/41	5/41
	FBNSV ^d	24/26	nt	38/41	nt
	ALCV + FBNSV ^e		0/26		5/41

^a Number of ALCV - positive leaf discs tested by qPCR or nested - PCR after IAP of 24 or 48 h by aphids from mono - infected plants. ^b Number of FBNSV - positive leaf discs tested by qPCR after IAP of 24 or 48 h by aphids from mono - infected plants. ^c Number of ALCV - positive leaf discs tested by qPCR or nested - PCR after IAP of 24 or 48 h by aphids from co - infected plants. ^d Number of FBNSV - positive leaf discs tested by qPCR after IAP of 24 or 48 h by aphids from co - infected plants. ^e Number of ALCV - (tested by nested - PCR) and FBNSV - positive (tested by qPCR) leaf discs after IAP of 24 or 48 h by aphids from co - infected plants.

In contrast, ALCV DNA could be detected by qPCR only after a longer IAP period of 48 h, in only 2 leaf-discs out of 38 tested in this condition, and only when aphids had previously acquired the virus from mono-infected plants. To confirm this unexpected low rate of ALCV inoculation with respect to its relatively high accumulation in aphid heads (Figure 2), the presence of ALCV DNA was further assessed by nested-PCR. With this more sensitive technique, all leaf-discs proved negative after a 24-h IAP, while a few gave a positive signal after the longer 48-h IAP, with aphids fed on either mono-infected (9/38) or co-infected (5/41) plants (Table 1).

In the case of co-infection, the five leaf-discs where ALCV DNA could be detected also contained FBNSV DNA (Table 1), showing that the two viruses can be secreted in the saliva of the same individual aphid. Interestingly, a Chi² test showed no statistical difference in the presence of ALCV or FBNSV DNA in leaf-discs whether aphids had previously been fed on mono- or co-infected plants (*p*-value = 0.24 and 1, respectively), revealing no interference between these viruses for inoculation success.

1.14. FBNSV Antagonizes ALCV at the Onset of Infection after Co-Transmission by Aphids.

Finally, beyond release into leaf-discs, we tested whether ALCV can be transmitted effectively to plants when it is co-inoculated together with FBNSV by the aphid vector. Transmission tests from mono- and co-infected plants showed that FBNSV is always transmitted much more efficiently than ALCV (Table 2), consistent with their respective release into leaf discs (Table 1). Nevertheless, the ALCV transmission rate from mono-infected plants was significantly higher than that from co-infected plants (Table 2), which may be interpreted as a negative interference of FBNSV. Intriguingly, however, in the only two plants infected with ALCV in co-transmission experiments, FBNSV was not present. It is thus possible to imagine that FBNSV might only affect ALCV within the newly inoculated plant solely at the onset of infection, but not during the whole cycle within the vector.

Table 2. Co-transmission testing of FBNSV and ALCV.

Source plants	Detection	Transmission rate	
		Test 1-4	Test 5
Mono-inoculation	ALCV ^a	4/30	16/28
	FBNSV ^b	19/20	5/7
Co-inoculation	ALCV ^c	0/54	2/29
	FBNSV ^d	49/54	27/29
	ALCV + FBNSV ^e	0/54	0/29

^aNumber of plants infected after transmission of ALCV from mono - infected plants. ^bNumber of plants infected after transmission of FBNSV from mono - infected plants. ^cNumber of plants infected by ALCV after transmission from co - infected plants. ^dNumber of plants infected by FBNSV after transmission from co - infected plants. ^eNumber of plants infected by ALCV and FBNSV after transmission from co - infected plants.

Discussion

Numerous studies and reviews have cited the common features of the two families *Geminiviridae* and *Nanoviridae* to assume similar mechanisms of transmission for all ssDNA plant viruses [1,2,32,33]. Because no gemini- and nanovirus members were known to share a common vector species, this assumption was difficult to confirm. The discovery of ALCV and its aphid vector opened, for the first time, the opportunity to compare the life cycle of a geminivirus (ALCV) and a nanovirus (FBNSV) within a common host plant and its common insect vector.

1.15. Co-Infection of Plants by a Nanovirus and a Geminivirus

Co-infections of plants are common, if not the rule, in nature [34]. Yet, to our knowledge, the co-acquisition and inoculation of ALCV and FBNSV by aphids is the first report of co-circulation within the same insect vector for circulative viruses that belong to different families. However, the frequent co-infection of whitefly-transmitted geminiviruses and nanovirus-like alphasatellites (formerly named DNA1) suggests that co-infection of geminiviruses and nanoviruses is a widespread phenomenon [35,36]. Alphasatellites have the highly conserved nanovirus-like sequence motif TAGTATTAC and a replication associated gene (Rep) homologous to that of nanoviruses, indicating that these satellites may have evolved from components of nanoviruses, perhaps from historical occurrences of co-infection [37]. The experimental co-infection of ALCV and FBNSV described in the present paper provides direct proof that gemini- and nano-viruses can co-infect plants. Moreover, the detection of co-infected cells within these plants is consistent with inter-family recombination, as illustrated by the defective def19 DNA molecule found associated with a begomovirus [35]. In our experimental conditions, co-infection was possible only via co-agroinoculation. Co-infection by aphid vectors, although highly probable, remains to be confirmed.

1.16. Possible Interference between ALCV and FBNSV

The accumulation of FBNSV DNA in the abdomens and heads of aphid vectors was lower when FBNSV was co-acquired with ALCV. Several explanations can be proposed: i) For unknown reasons, the accumulation of FBNSV could be lower in the sieve elements of plants co-infected with ALCV; a comparative quantification of FBNSV in total leaf tissues (as here) and phloem exudates could confirm or refute this hypothesis. ii) The presence of ALCV could elicit insect defense mechanisms (e.g., autophagy) as shown for other geminiviruses [9], which might differentially affect FBNSV and ALCV. iii) The two viruses could compete for entry and/or accumulation in aphid AMG cells [38], and ALCV could partially outcompete FBNSV. The latter seems improbable, however, since the two viruses seemingly use distinct entry and accumulation routes (see below).

The transmission results were quite unexpected. While the accumulation of ALCV DNA in the midgut is about 10 times higher than that of FBNSV, the latter is transmitted 2–10 times more efficiently than ALCV, irrespective of infection status. Unexpectedly, the negative impact of ALCV on FBNSV accumulation did not impair its excretion into leaf discs or its transmission. Also

unexpected was the observation that, while the accumulation of ALCV is not affected by the presence of FBNSV, its transmission rate appears reduced. This cannot be explained by a deficiency in ALCV excretion, because no significant differences could be detected when comparing mono- and co-infection. Instead, we hypothesize that FBNSV might block an early step in ALCV infection in the host plant after co-inoculation by aphids. In support of this hypothesis, we observed that when FBNSV was inoculated earlier and in larger amounts in the leaf discs, test plants in co-transmission experiments became infected predominantly with FBNSV alone, with ALCV infecting only those rare plants where FBNSV infection failed.

1.17. Distinct Intracellular Pathways for Nanovirus and Capulavirus in the Insect Vector

Although ALCV and FBNSV infect the same cells of the AMG, they do not co-localize in the cytoplasm of these cells. This original observation is consistent with the prediction that geminiviruses and nanoviruses may follow distinct subcellular pathways across their insect vectors. Unfortunately, due to limited sensitivity and/or accessibility, viral DNAs were not detectable in PSG under our experimental conditions, as reported earlier [12,22].

The absence of intracellular colocalization of ALCV and FBNSV DNAs may reflect different transmembrane receptors that may, in turn, guide these viruses into distinct routes across the cells. The absence of homology between the proteins that are reported to bind putative insect receptors for geminiviruses (CP) [1,10,39] and nanoviruses (NSP) [20–22] is consistent with this interpretation. Other compelling evidence in support of this interpretation is that ALCV is specifically transmitted only by certain populations of *A. craccivora* [12], whereas FBNSV is more widely transmitted by *A. pisum*, *Myzus persicae* and *A. craccivora* [40]. Although several studies have analyzed insect–virus interactions in the two viral families [41–43], no receptor(s) have been identified so far. Thus, further effort is needed to confirm and provide experimental support to molecular models of the different transmission pathways adopted by nano- and geminiviruses as suggested here from comparison of FBNSV and ALCV.

Conclusions

Our results demonstrate that the transmission pathways of ALCV and FBNSV are qualitatively and quantitatively different in the vector *A. craccivora*. This original result is consistent with the prediction that geminiviruses and nanoviruses have evolved different virus–vector interactions. The low rate of ALCV transmission by aphids reported earlier [13] is confirmed here by comparison with a nanovirus under the same experimental conditions and with the same *A. craccivora* cohort. Altogether, these results indicate that ALCV has not evolved virus–aphid interactions that readily lead to high transmission efficiencies. It is remarkable that the eight components of the nanovirus were conveyed from plant to plant by the aphid vector more easily than the unique capulavirus component.

Author Contributions: The following statements should be used “Conceptualization, J - L.Z., M.P., J.D.M., F.R. and S.B.; methodology, J.D.M., F.R., M.S.V., E.P. and J.L.Z.; validation, J.D.M., F.R., N.S., J.L.Z., M.P. and S.B.; writing—original draft preparation, J.D.M.; writing—review and editing, J.L.Z., M.P. and S.B.; supervision, J.L.Z., M.P., N.S. and S.B.; project administration, M.P. and S.B.; funding acquisition, M.P. and S.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: MP acknowledges support from CIRAD. SB, MSV, EP and NS acknowledge support from INRAE, and JLZ from IRD. This work was funded by French ANR grant N° ANR - 18 - CE92 - 0028 - 01.

Acknowledgments: We are grateful to Sophie Leblaye for plants and aphids production and maintenance.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Hogenhout, S.A.; El Ammar, D.; Whitfield, A.E.; Redinbaugh, M.G. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2008**, *46*, 327–359, doi:10.1146/annurev.phyto.022508.092135.
2. Blanc, S.; Drucker, M.; Uzest, M. Localizing viruses in their insect vectors. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2014**, *52*,

- 403–425, doi:10.1146/annurev-phyto-102313-045920.
3. Ammar, E.D.; Gargani, D.; Lett, J.M.; Peterschmitt, M. Large accumulations of maize streak virus in the filter chamber and midgut cells of the leafhopper vector *Cicadulina mbila*. *Arch. Virol.* **2009**, *154*, 255–262, doi:10.1007/s00705-008-0308-2.
 4. Watanabe, S.; Bressan, A. Tropism, compartmentalization and retention of banana bunchy top virus (Nanoviridae) in the aphid vector *Pentalonia nigronervosa*. *J. Gen. Virol.* **2013**, *94*, 209–219, doi:10.1099/vir.0.047308-0.
 5. Vetten, H.J.; Dale, J.L.; Grigoras, I.; Gronenborn, B.; Harding, R.; Randles, J.W.; Thomas, J.E.; Timchenko, T.; Yeh, H.H. Virus taxonomy: The classification and nomenclature of viruses: The 9th report of the ICTV. In *Nanoviridae*; King, A.M.Q., Lefkowitz, E.J., Adams, M.J., Carstens, E.B., Eds.; Elsevier-AP Press: Amsterdam, The Netherlands, 2011; pp. 395–404.
 6. Czosnek, H.; Ghanim, M. Back to Basics: Are Begomoviruses Whitefly Pathogens? *J. Integr. Agric.* **2012**, *11*, 225–234, doi:10.1016/S2095-3119(12)60007-0.
 7. Varsani, A.; Navas-Castillo, J.; Moriones, E.; Hernandez-Zepeda, C.; Idris, A.; Brown, J.K.; Murilo Zerbini, F.; Martin, D.P. Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus. *Arch. Virol.* **2014**, *159*, 2193–2203, doi:10.1007/s00705-014-2050-2.
 8. Bejerman, N. *Geminivirus–Vector Relationship*; Springer: Cham, Switzerland, 2019; pp. 137–145, doi:10.1007/978-3-030-18248-9_8.
 9. Wang, L.L.; Wang, X.R.; Wei, X.M.; Huang, H.; Wu, J.X.; Chen, X.X.; Liu, S.S.; Wang, X.W. The autophagy pathway participates in resistance to tomato yellow leaf curl virus infection in whiteflies. *Autophagy* **2016**, *12*, 1560–1574, doi:10.1080/15548627.2016.1192749.
 10. Zerbini, F.M.; Briddon, R.W.; Idris, A.; Martin, D.P.; Moriones, E.; Navas-Castillo, J.; Rivera-Bustamante, R.; Roumagnac, P.; Varsani, A.; Ictv Report, C. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 131–133, doi:10.1099/jgv.0.000738.
 11. Roumagnac, P.; Granier, M.; Bernardo, P.; Deshoux, M.; Ferdinand, R.; Galzi, S.; Fernandez, E.; Julian, C.; Abt, I.; Filloux, D.; et al. Alfalfa Leaf Curl Virus: An Aphid-Transmitted Geminivirus. *J. Virol.* **2015**, *89*, 9683–9688, doi:10.1128/JVI.00453-15.
 12. Ryckebusch, F.; Sauvion, N.; Granier, M.; Roumagnac, P.; Peterschmitt, M. Alfalfa leaf curl virus is transmitted by *Aphis craccivora* in a highly specific circulative manner. *BioRxiv* **2019**, doi:10.1101/832204. (under review).
 13. Ryckebusch, F.; Peterschmitt, M.; Granier, M.; Sauvion, N. Alfalfa leaf curl virus is efficiently acquired by its aphid vector *Aphis craccivora* but inefficiently transmitted. *BioRxiv* **2020**. (under review).
 14. Hipper, C.; Brault, V.; Ziegler-Graff, V.; Revers, F. Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4*, 154, doi:10.3389/fpls.2013.00154.
 15. Hunter, W.B.; Hiebert, E.; Webb, S.E.; Tsai, J.H.; Polston, J.E. Location of Geminiviruses in the Whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Plant Dis.* **1998**, *82*, 1147–1151, doi:10.1094/PDIS.1998.82.10.1147.
 16. Bressan, A.; Watanabe, S. Immunofluorescence localisation of Banana bunchy top virus (family Nanoviridae) within the aphid vector, *Pentalonia nigronervosa*, suggests a virus tropism distinct from aphid-transmitted luteoviruses. *Virus Res.* **2011**, *155*, 520–525, doi:10.1016/j.virusres.2010.12.005.
 17. Wei, J.; Zhao, J.J.; Zhang, T.; Li, F.F.; Ghanim, M.; Zhou, X.P.; Ye, G.Y.; Liu, S.S.; Wang, X.W. Specific cells in the primary salivary glands of the whitefly *Bemisia tabaci* control retention and transmission of begomoviruses. *J. Virol.* **2014**, *88*, 13460–13468, doi:10.1128/JVI.02179-14.
 18. Briddon, R.W.; Pinner, M.S.; Stanley, J.; Markham, P.G. Geminivirus coat protein gene replacement alters insect specificity. *Virology* **1990**, *177*, 85–94, doi:10.1016/0042-6822(90)90462-z.
 19. Azzam, O.; Frazer, J.; de la Rosa, D.; Beaver, J.S.; Ahlquist, P.; Maxwell, D.P. Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology* **1994**, *204*, 289–296, doi:10.1006/viro.1994.1533.
 20. Franz, A.W.; van der Wilk, F.; Verbeek, M.; Dulleman, A.M.; van den Heuvel, J.F. Faba bean necrotic yellows virus (genus *Nanovirus*) requires a helper factor for its aphid transmission. *Virology* **1999**, *262*, 210–219, doi:10.1006/viro.1999.9904.
 21. Grigoras, I.; Vetten, H.J.; Commandeur, U.; Ziebell, H.; Gronenborn, B.; Timchenko, T. Nanovirus DNA-N encodes a protein mandatory for aphid transmission. *Virology* **2018**, *522*, 281–291, doi:10.1016/j.virol.2018.07.001.
 22. Di Mattia, J.; Vernerey, M.S.; Yvon, M.; Pirolles, E.; Villegas, M.; Gaafar, Y.; Ziebell, H.; Michalakakis, Y.; Zeddam, J.L.; Blanc, S. Route of a multipartite (nano)virus across the body of its aphid vector. *J. Virol.* **2020**, doi:10.1128/JVI.01998-19.
 23. Grigoras, I.; Timchenko, T.; Katul, L.; Grande-Perez, A.; Vetten, H.J.; Gronenborn, B. Reconstitution of

- authentic nanovirus from multiple cloned DNAs. *J. Virol.* **2009**, *83*, 10778–10787, doi:10.1128/JVI.01212-09.
24. Sicard, A.; Yvon, M.; Timchenko, T.; Gronenborn, B.; Michalakakis, Y.; Gutierrez, S.; Blanc, S. Gene copy number is differentially regulated in a multipartite virus. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2248, doi:10.1038/ncomms3248.
 25. Boissinot, S.; Pichon, E.; Sorin, C.; Piccini, C.; Scheidecker, D.; Ziegler-Graff, V.; Brault, V. Systemic propagation of a fluorescent infectious clone of a polerovirus following inoculation by agrobacteria and aphids. *Viruses* **2017**, *9*, 166, doi:10.3390/v9070166.
 26. Vernerey, M.S.; Pirolles, E.; Sicard, A.; Blanc, S. Localizing Genome Segments and Protein Products of a Multipartite Virus in Host Plant Cells. *Bio-Protocol* **2019**, *9*, doi:10.21769/BioProtoc.3443.
 27. Sicard, A.; Pirolles, E.; Gallet, R.; Vernerey, M.S.; Yvon, M.; Urbino, C.; Peterschmitt, M.; Gutierrez, S.; Michalakakis, Y.; Blanc, S. A multicellular way of life for a multipartite virus. *eLife* **2019**, *8*, e43599, doi:10.7554/eLife.43599.
 28. Ghanim, M.; Brumin, M.; Popovski, S. A simple, rapid and inexpensive method for localization of Tomato yellow leaf curl virus and *Potato leafroll* virus in plant and insect vectors. *J. Virol. Methods* **2009**, *159*, 311–314, doi:10.1016/j.jviromet.2009.04.017.
 29. Gallet, R.; Fabre, F.; Michalakakis, Y.; Blanc, S. The number of target molecules of the amplification step limits accuracy and sensitivity in ultra deep sequencing viral population studies. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00561-17, doi:10.1128/JVI.00561-17.
 30. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2017. Available online: <http://www.r-project.org> (2019/12/14).
 31. Franz, A.; Makkouk, K.M.; Vetten, H.J. Host range of faba bean necrotic yellows virus and potential yield loss in infected faba bean. *Phytopathol. Mediterr.* **1997**, *36*, 94–103.
 32. Gronenborn, B. Nanoviruses: Genome organisation and protein function. *Vet. Microbiol.* **2004**, *98*, 103–109, doi:10.1016/j.vetmic.2003.10.015.
 33. Timchenko, T.; Bernardi, F. Les nanovirus, petits virus de plantes: Similitudes et différences avec les géminivirus. *Virologie* **2007**, *11*, 27–42, doi:10.1684/vir.2007.0046.
 34. Moreno, A.B.; Lopez-Moya, J.J. When viruses play team sports: Mixed infections in plants. *Phytopathology* **2020**, *110*, 29–48, doi:10.1094/PHYTO-07-19-0250-FI.
 35. Saunders, K.; Stanley, J. A nanovirus-like DNA component associated with yellow vein disease of *Ageratum conyzoides*: Evidence for interfamilial recombination between plant DNA viruses. *Virology* **1999**, *264*, 142–152, doi:10.1006/viro.1999.9948.
 36. Mansoor, S.; Khan, S.H.; Hussain, M.; Zafar, Y.; Pinner, M.S.; Briddon, R.W.; Stanley, J.; Markham, P.G. Association of a begomovirus and nanovirus-like molecule with *Ageratum* Yellow Vein Disease in Pakistan. *Plant Dis.* **2000**, *84*, 101, doi:10.1094/PDIS.2000.84.1.101A.
 37. Stanley, J. Subviral DNAs associated with geminivirus disease complexes. *Vet. Microbiol.* **2004**, *98*, 121–129, doi:10.1016/j.vetmic.2003.10.005, doi:10.1016/j.vetmic.2003.10.005.
 38. Simon, K.O.; Cardamone, J.J., Jr.; Whitaker-Dowling, P.A.; Youngner, J.S.; Widnell, C.C. Cellular mechanisms in the superinfection exclusion of vesicular stomatitis virus. *Virology* **1990**, *177*, 375–379, doi:10.1016/0042-6822(90)90494-c.
 39. Gray, S.; Cilia, M.; Ghanim, M. Circulative, “nonpropagative” virus transmission: An orchestra of virus-, insect-, and plant-derived instruments. *Adv. Virus Res.* **2014**, *89*, 141–199, doi:10.1016/B978-0-12-800172-1.00004-5.
 40. Sicard, A.; Zeddani, J.L.; Yvon, M.; Michalakakis, Y.; Gutierrez, S.; Blanc, S. Circulative nonpropagative aphid transmission of nanoviruses: An oversimplified view. *J. Virol.* **2015**, *89*, 9719–9726, doi:10.1128/JVI.00780-15.
 41. Watanabe, S.; Borthakur, D.; Bressan, A. Localization of Banana bunchy top virus and cellular compartments in gut and salivary gland tissues of the aphid vector *Pentalonia nigronervosa*. *Insect Sci.* **2016**, *23*, 591–602, doi:10.1111/1744-7917.12211.
 42. Pan, L.L.; Chen, Q.F.; Zhao, J.J.; Guo, T.; Wang, X.W.; Hariton-Shalev, A.; Czosnek, H.; Liu, S.S. Clathrin-mediated endocytosis is involved in Tomato yellow leaf curl virus transport across the midgut barrier of its whitefly vector. *Virology* **2017**, *502*, 152–159, doi:10.1016/j.virol.2016.12.029.
 43. Xia, W.Q.; Liang, Y.; Chi, Y.; Pan, L.L.; Zhao, J.; Liu, S.S.; Wang, X.W. Intracellular trafficking of begomoviruses in the midgut cells of their insect vector. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*, e1006866, doi:10.1371/journal.ppat.1006866.



3. Conclusion et discussion

Dans cette publication, nous avons donc montré que le capulavirus ALCV et le nanovirus FBNSV empruntent des voies intracellulaires différentes chez leur vecteur et y utilisent vraisemblablement des récepteurs distincts, expliquant une absence d'interférence.

Le fait que l'ALCV n'arrive pas à infecter la fève lorsqu'il est co-transmis par puceron conjointement avec le FBNSV ne proviendrait pas d'une interaction délétère dans le vecteur, mais serait plutôt dû à une compétition se produisant dans la plante aux stades précoces de l'infection. Il serait intéressant d'examiner les mécanismes compétitifs qui conduisent à cette absence de co-infection des plantes malgré une co-inoculation effective par le vecteur *A. craccivora*.

Le résultat majeur de ces travaux réside dans la localisation intracellulaire distincte des deux virus au niveau de l'AMG du vecteur. Cela implique que les deux virus s'accumulent dans des structures distinctes. Cette localisation différente pourrait s'expliquer par le fait que ces virus utiliseraient des stratégies différentes pour pénétrer dans les cellules intestinales. Les geminivirus utilisent la « stratégie capsidale » à la différence des nanovirus qui emploient la stratégie « helper » pour interagir avec le vecteur. Cette différence amène à penser que ces deux familles de virus ne cibleraient pas les mêmes récepteurs et pourraient donc par la suite utiliser des voies de transport et des structures d'accumulation différentes au niveau des cellules de l'AMG. De même, le FBNSV est transmissible par au moins trois espèces de pucerons (*A. pisum*, *A. craccivora* et *M. persicae*) alors que l'ALCV ne peut lui être transmis que par *A. craccivora*. Cette spécificité vectorielle conforte l'idée que ces virus n'utilisent pas les mêmes voies pour pénétrer et/ou circuler au sein de leur vecteur. Seule l'identification des récepteurs et des structures subcellulaires impliquées dans la transcytose du FBNSV et de l'ALCV permettra de confirmer ou non cette hypothèse.

Depuis la sortie de la publication, nous nous sommes aperçus d'une erreur dans les fichiers de calculs des qPCR qui a résulté en une sous-estimation d'un facteur 10 000 de l'accumulation du FBNSV. L'ALCV est donc en réalité 1 000 fois moins accumulé dans la plante. C'est notamment cette erreur qui explique que nous ayons vu une accumulation de l'ALCV très supérieure à celle du FBNSV. Cependant, il est très important de noter que cette erreur ne change en rien l'ensemble de nos conclusions. En effet, celles-ci sont issues de la comparaison de l'accumulation et de la transmission de l'ALCV et du FBNSV entre les co-infections et les infections par un seul virus. Il reste donc absolument vrai que l'ALCV et le FBNSV n'ont pas d'impact l'un sur l'autre. Les résultats de localisation en FISH et les conclusions ne sont pas non plus affectées par cette erreur de quantification.

Nous réfléchissons à publier un erratum dans un avenir proche, néanmoins, afin de corriger les valeurs d'accumulation, seule en cause dans cet article.

4. Références hors articles

- Di Mattia, J., M. S. Vernerey, M. Yvon, E. Pirolles, M. Villegas, Y. Gaafar, H. Ziebell, Y. Michalakis, J. L. Zeddani, et S. Blanc. 2020. « Route of a Multipartite Nanovirus across the Body of Its Aphid Vector ». *Journal of Virology* 94(9). doi: 10.1128/JVI.01998-19.
- Gronenborn, Bruno, J. W. Randles, D. Knierim, Q. Barrière, H. J. Vetten, Norman Warthmann, David Cornu, Tiata Sileye, Stephan Winter, et Tatiana Timchenko. 2018. « Analysis of DNAs associated with coconut foliar decay disease implicates a unique single-stranded DNA virus representing a new taxon ». *Scientific Reports* 8. doi: 10.1038/s41598-018-23739-y.
- Roumagnac, P., M. Granier, P. Bernardo, M. Deshoux, R. Ferdinand, S. Galzi, E. Fernandez, C. Julian, I. Abt, D. Filloux, F. Mesléard, A. Varsani, S. Blanc, D. P. Martin, et M. Peterschmitt. 2015. « Alfalfa Leaf Curl Virus: An Aphid-Transmitted Geminivirus ». *Journal of Virology* 89(18):9683. doi: 10.1128/JVI.00453-15.
- Ryckebusch, F., N. Sauvion, M. Granier, P. Roumagnac, et M. Peterschmitt. 2020. « Alfalfa Leaf Curl Virus Is Transmitted by Aphis Craccivora in a Highly Specific Circulative Manner ». *Virology* 546:98–108. doi: 10.1016/j.virol.2020.04.004.

**CHAPITRE 3 : LES MECANISMES DE LA
TRANSMISSION PAR VECTEUR
FAVORISERAIENT LE MAINTIEN DE
L'INTEGRITE DU GENOME MULTIPARTITE
DES NANOVIRUS**

1. Mise en contexte et résumé

Ce chapitre de ma thèse décrit des résultats qui sont quasiment prêts à être soumis pour publication. Il contient donc le manuscrit en préparation qui est sous une forme quasi-définitive. Les résultats des analyses statistiques formelles sont en cours de finalisation par Yannis Michalakis et seront intégrés avant soumission.

De nombreuses études évoquent les coûts et avantages de l'architecture multipartite des génomes viraux (**Pressing et Reaney 1984**; **Nee 1987**; **Chao 1992**; **Iranzo et Manrubia 2012**; **Sicard et al. 2016**). Les avantages proposés dans la littérature seraient les suivants : (i) la segmentation du génome en plusieurs morceaux diminue la taille des segments à répliquer, ce qui réduit la probabilité pour un segment donné d'incorporer une ou plusieurs mutations (**Pressing et Reaney 1984**), (ii) la réplication du génome est plus rapide, car chaque segment peut être répliqué en parallèle (**Nee 1987**), et (iii) la segmentation du génome offre la possibilité de réaliser des échanges de segments (réassortiments) entre deux virus apparentés, et favorise ainsi les échanges génétiques (**Chao 1992**). La critique majeure que l'on peut faire est le fait que tous ces avantages s'appliquent également aux virus segmentés, qui encapsident une copie de chaque segment par particule virale; ils n'expliquent donc pas spécifiquement l'encapsidation séparée des segments des génomes multipartites.

Comme ont pu le montrer **Iranzo et Manrubia (2012)** grâce à des modèles théoriques, la multi-encapsidation représente un coût non négligeable pour le virus, directement lié à la possibilité de perdre un segment lors de la transmission. Ces auteurs ont élaboré un modèle mathématique permettant de simuler une compétition entre un virus monopartite et un variant multipartite (pouvant avoir un nombre variable de segments), et d'estimer le nombre minimum de particules devant entrer dans chaque cellule pour que les variants multipartites soient efficacement transmis et puissent éventuellement gagner la compétition. Dans le cas simple des virus monopartites, la transmission d'une seule particule est suffisante pour assurer l'infection c'est-à-dire qu'ils peuvent avoir une MOI (Multiplicity Of Infection, définie ici comme le nombre de génomes viraux infectant une cellule) très basse, même égale à 1, ce qui ne marche évidemment pas pour un multipartite. La réussite d'une infection devient en effet plus compliquée pour un virus bipartite puisque, par exemple pour une MOI deux fois supérieur, lors d'un « tirage » au hasard de 2 particules dans un pool où les deux segments génomiques sont à égale fréquence, la probabilité de tirer 2 fois le même segment est de 0,5. Ainsi, dans 50% des cas, un seul segment est présent (à deux copies) et il manque alors de l'information génétique, entraînant l'échec de l'infection. Pour qu'un variant multipartite puisse arriver à se fixer dans la population dans les conditions de leur modèle, **Iranzo et Manrubia (2012)** ont estimé qu'il faut une MOI moyenne environ égale à

2 pour un bipartite, à 30 pour un tripartite, et au-delà de 100 pour un nombre de segments supérieur à 3. Ces valeurs de MOI peuvent varier selon les paramétrages du modèle puisqu'elles sont liées à la fois à la probabilité d'infecter efficacement une cellule (présence d'au moins une copie de chaque segment dans la cellule) et à l'avantage sélectif que les auteurs ont choisi d'attribuer aux variants multipartites. La principale conclusion de cet article est que des variants multipartites avec plus de trois ou quatre segments ne pourraient se fixer dans la population que si les valeurs de MOI étaient de l'ordre de plusieurs centaines (valeurs généralement considérées comme irréalistes par la communauté scientifique), et ce quel que soit l'avantage sélectif qu'ils présenteraient vis-à-vis de leur ancêtre monopartite. Il est important de préciser que, dans leur étude, ces auteurs considèrent que les différents segments s'accumulent à égale fréquence dans l'hôte. Or, mon équipe d'accueil a récemment démontré que l'existence de la formule génomique (certains segments sont fréquents et d'autres sont rares ; (**Sicard et al. 2013**)) augmente grandement la probabilité de perte d'un des segments rares, et augmente ainsi la MOI nécessaire pour que les variants multipartites puissent se fixer dans cette modélisation (**Gallet et al. 2018**). Dans ce même article, mon équipe d'accueil a aussi calculé que seulement une quarantaine de particules virales infectieuses sont efficacement transmises à une nouvelle plante par un puceron, entraînant fréquemment l'échec de l'infection du fait de la perte d'un segment rare. Ces résultats accroissent encore le questionnement sur l'existence si fréquente des virus multipartites. Ces données reposent de manière aigüe la question du coût dans ces systèmes viraux et des possibles mécanismes, inconnus, qui pourraient les réduire.

L'étude du trajet du FBNSV dans son insecte vecteur (Chapitre 1) donne certains éléments permettant d'envisager un processus qui pourrait diminuer les risques de perte d'un segment. En effet, la colocalisation des 8 segments du FBNSV dans les cellules de l'AMG et dans certaines cellules des PSG du puceron (**Di Mattia et al. 2020**) démontre que les segments du virus entrent en masse et ainsi restent groupés dans le vecteur. Pour aller plus loin, nous avons cherché à savoir si des segments acquis soit séparément par deux pucerons différents, soit séquentiellement par un même puceron, pouvaient in fine se retrouver et reconstituer un génome complet. Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur les résultats publiés en 2018 par **Grigoras et al.** montrant qu'une infection des plantes par un lot incomplet de segments était possible lorsque l'un des segments C, N, U1, U2 ou U4 était absent. Ces auteurs ont montré que des plantes infectées sans les segments C, N et U4 ne montrent aucune différence (au niveau symptômes et accumulation virale) par rapport à des plantes témoins infectées avec le génome viral complet. Par contre, il n'est pas

possible de transmettre le virus par pucerons à partir de plantes infectées sans le segment N, ce que nous avons pu également confirmer (**Grigoras et al. 2018; Di Mattia et al. 2020**).

Nous avons réalisé des tests de transmission à partir de plantes infectées par des lots incomplets de segments du FBNSV dans lesquels l'un des trois segments : C, N ou U4 (plantes respectivement nommées FBNSV-C, FBNSV-N ou FBNSV-U4) est manquant. À partir de ces plantes, nous avons réalisé deux types d'expérimentations:

(a) une acquisition par deux pucerons s'étant alimentés l'un sur une plante FBNSV-C et l'autre sur une plante FBNSV-U4. La transmission est ensuite réalisée par les deux pucerons déposés ensemble sur une même plante saine. Cette expérimentation, dénommée transmission « parallèle », permet d'observer si deux lots de segments incomplets mais complémentaires peuvent être inoculés et se répliquer dans une même plante et y reconstituer un génome complet.

(b) une acquisition « séquentielle » dans laquelle un seul et même puceron se nourrit successivement sur deux plantes, chacune étant infectée par des lots de segments complémentaires. Le puceron est ensuite déposé sur une plante saine pour la transmission. Quatre modalités différentes ont été testées lors de cette expérimentation. Les pucerons ont été placés successivement sur des plantes infectées par des lots incomplets du FBNSV : (i) FBNSV-C puis FBNSV-U4, (ii) FBNSV-U4 puis FBNSV-C, (iii) FBNSV-N puis FBNSV-U4 ainsi que (iv) FBNSV-U4 puis FBNSV-N. Suite à ces acquisitions séquentielles, les pucerons sont déposés sur des plantes saines, à raison de un puceron par plante, afin d'évaluer la possibilité de reconstitution du génome complet lors de la transmission. Pour chacune des modalités testées, nous avons testés 4 temps de « purge » sur plante saine entre les deux acquisitions (0, 1, 2 et 3 jours). La purge vise à permettre au bol alimentaire contenant le premier lot de segments acquis d'être éliminé afin que l'obtention d'une éventuelle reconstitution ne soit pas due au mélange des deux lots de segments dans le bol alimentaire (**Wright, Fisher, et Mittler 1985**). Cette expérimentation, dénommée transmission « séquentielle », permet d'observer si deux lots de segments incomplets mais complémentaires peuvent se regrouper dans le puceron, reconstituant le génome complet qui sera inoculé.

Les résultats des tests de transmission des modalités « parallèle » et « séquentielle » ont montré que la reconstitution du génome complet du FBNSV est possible dans l'ensemble des expérimentations (a et b) et des modalités (i à iv) (**Figure 1**, numérotation comme dans le manuscrit ci-dessous). Le contrôle de la présence des segments C, N ou U4 (selon les combinaisons testées) dans les plantes infectées montre que la modalité « séquentielle »

conduit à un meilleur taux de reconstitution avec 66% contre 22% pour la transmission « parallèle ».

Pour la transmission de la modalité « séquentielle », nous avons dans un premier temps comparé les taux d'infection et de reconstitution des 4 modalités sans jour de purge. Les modalités (i) et (ii), mettant en jeu les segments C et U4, ont montré que les taux de transmission et de reconstitution sont plus importants quand C est acquis en premier que lorsqu'il est acquis en second (54% vs 31% d'infections et 32% vs 15% de reconstitutions). Pour les modalités (iii) et (iv), mettant en jeu le facteur assistant à la transmission (produit du segment N), les résultats des tests de transmission sont plus variables et ne montrent pas de différence claire en fonction de l'ordre d'acquisition de NSP. Les taux de transmission et de reconstitution restent en moyenne dans les mêmes proportions que lors de l'acquisition séquentielle mettant en jeu les segments C et U4. Dans un second temps, nous avons comparé les taux de transmission et de reconstitution pour la transmission « séquentielle », mais cette fois-ci avec 0, 1, 2 ou 3 jours de purge sur plantes saines entre les deux acquisitions. Notamment, nous avons observé une diminution des taux d'infection et de reconstitution qui est d'autant plus importante que le puceron a passé plus de temps sur plante saine entre les deux acquisitions (**Figure 2**).

Les résultats des transmissions de la modalité « séquentielle » mettant en jeu le facteur assistant à la transmission ont montré que la reconstitution est observable que NSP soit acquis en premier (avant U4) ou en second (après U4). Cette reconstitution est même possible après plusieurs jours de purge, mettant en avant la possibilité pour NSP ou U4 « d'attendre » probablement sans être immédiatement internalisés dans le vecteur pour ensuite être transmis. Outre les conclusions directes pour cet article sur la reconstitution des génomes, le fait que NSP puisse assister la transmission d'un autre segment acquis ultérieurement est très surprenant par rapport au mode d'action communément admis pour les facteurs assistants de la transmission par vecteur. Ce résultat est mis en exergue dans le manuscrit ci-dessous et sera discuté plus avant dans la partie conclusion et perspective de ce chapitre ainsi que dans le Chapitre 5.

Dans l'ensemble des expériences, et malgré la reconstitution fréquente de génomes complets, de nombreuses plantes se sont retrouvées infectées sans la totalité des segments. Nous avons comparé le taux de perte des segments C, N et U4 sur les 158 plantes infectées. Le segment U4 est le plus perdu avec 33% (52/158) des plantes infectées. Pour les segments C et N, les taux sont plus bas avec respectivement 14% (22/158) et 2% (3/158). Le temps de purge sur plantes saines entre les deux acquisitions a un effet variable

selon les segments. Nous n'observons aucun effet pour le segment N, alors que le taux de perte du segments C et plus encore du segment U4 augmente avec le temps de purge.

Afin de confirmer qu'une reconstitution du génome complet est possible dès l'entrée des particules virales dans le puceron, nous avons utilisé le FISH pour localiser deux segments acquis successivement (**Figure 3 et S1**). Les résultats montrent que deux segments acquis à un jour d'intervalle s'accumulent dans les mêmes agrégats cytoplasmiques. L'ordre d'acquisition de ces segments semble n'avoir que peu d'importance. En relation avec le Chapitre 1, il est intéressant de noter que les contrôles nommés « all segments » ont aussi permis de compléter les résultats de colocalisation par paires présentés dans (**Di Mattia et al. 2020**) en établissant définitivement que les 8 segments viraux sont présents tous ensemble au sein des agrégats (**Figure S1**). Enfin, le contrôle « without N » (**Figure S1**) confirme également que NSP est absolument nécessaire à l'entrée du virus dans l'intestin (**cf. Chapitre 1 – (Di Mattia et al. 2020)**), mais que cette protéine peut être acquise avant ou après les particules virales (mise en contexte et implication de ce résultat dans le Chapitre 5).

L'ensemble des résultats présentés dans le manuscrit qui suit a permis de montrer qu'une reconstitution du génome viral est possible à partir de deux lots de segments incomplets, mais complémentaires. Pour confirmer que le virus reconstitué se comporte comme le FBNSV sauvage, des transmissions ont été réalisées à partir d'une plante infectée par le virus reconstitué après transmission « séquentielle » avec 1 jour de purge. Pour chacune des quatre modalités, nous avons utilisé une plante infectée ayant un génome viral reconstitué. Les transmissions réalisées à partir de ces plantes ont donné un taux d'infection moyen d'environ 36% (28/77 - proche des 40% obtenus en routine avec le FBNSV « sauvage »). Chez 26 des 28 plantes infectées, les segments C, N et U4 ont bien été transmis, démontrant ainsi que le FBNSV reconstitué se comporte comme le FBNSV sauvage.

2. Article : Non-concomitant host-to-host transmission of a multipartite virus genomic segments may lead to complete genome reconstitution.

Authors: Jérémy Di Mattia¹, Babil Torralba¹, Michel Yvon¹, Jean-Louis-Zeddani¹, Stéphane Blanc¹, Yannis Michalakis²

¹: PHIM, INRA, CIRAD, SupAgro, Univ Montpellier, Montpellier, France

²: MIVEGEC, CNRS, IRD, Univ Montpellier, Montpellier, France

a. Introduction

About >25% of annotated viral species have their genomic information carried by more than one nucleic acid molecule (**Lucía-Sanz et Manrubia 2017b**). The most well-known are the “segmented viruses” which package all their genomic segments in a single virion for transmission, such as the Influenza virus A. The “multipartite viruses”, despite being more numerous (~17% of all viral species) are much less studied, perhaps because their vast majority infects plants or fungi; these viruses package each individual segment in a distinct viral particles.

Multipartite viruses, despite having important economical and plant health consequences, are at present an evolutionary puzzle: while none of the proposed advantages is specific to this genomic architecture (all are shared with segmented viruses but an idiosyncratic and esoteric increased lifespan of viral particles observed in an artificial system (**Ojosnegros et al. 2011**), they face a potentially huge cost if the entire genomic information, i.e. all genomic segments, needs to be present concomitantly for the infection to function (**Sicard et al. 2016; Lucía-Sanz et Manrubia 2017b**). Indeed, if the different segments were transmitted randomly, an unrealistically large number of viral particles (multiplicity of infection; MOI) would need to enter each host cell, particularly for multipartite viruses with more than four segments (**Iranzo et Manrubia 2012; Gallet et al. 2018**).

Our work with the aphid-transmitted octopartite faba bean necrotic stunt virus (FBNSV, ssDNA, Family *Nanoviridae*, Genus *Nanovirus*) has added to the puzzle: we showed that (i) the eight genomic segments, each coding for one gene (**Di Mattia et al. 2020**), do not occur at equal frequencies within host plants; the frequency distribution converges to a host plant species specific distribution, which we termed “genome formula” (**Sicard et al. 2013**). The existence of the genome formula, subsequently revealed in two other multipartite viruses (**Hu et al. 2016; Wu et al. 2017**), other than unveiling another

biological 'weirdness' of these viruses begging for an explanation, adds to the evolutionary puzzle of their existence: if some segments are rare the MOI needs to be even higher. (ii) We subsequently showed that within individual hosts all viral segments do not need to be present within the same host cell, but that they may complement each other through inter-cellular trafficking of their function (protein or mRNA); this distributed mode of functioning should greatly reduce the within-host putative genomic integrity cost (**Sicard et al. 2019**). Nevertheless, all segments need to be present within an individual host, and thus the potential genomic integrity cost during between host transmission still needs to be addressed. We directly showed that very few copies of each segment were aphid-transmitted from plant to plant, two to three orders of magnitude fewer than predicted from evolutionary models (**Gallet et al. 2018**). This result was in agreement with the only other report on transmission bottlenecks in multipartite viruses, which found that only one or two copies of each segment of the tripartite cucumber mosaic virus was transmitted by aphids (**Betancourt et al. 2008**).

A possibility to circumvent the cost of host to host transmission, would be that the concomitant transmission of all genomic segments is not necessary: the segments could be sequentially acquired by aphids from different host plants and then transmitted, or different aphids could acquire different segments from different plants and then transmit them to the same plant (**Michalakis et Blanc 2020**). In this paper, we partly tested this hypothesis. We took advantage of the fact that, although all segments are found in field isolates, within host infection can be achieved in the lab if some of them are not present (**Timchenko et al. 2006; Grigoras et al. 2018**). We inoculated different sets of plants with incomplete genome viruses lacking different genomic segments. We then tested whether the complete viral genome could be reconstituted on receiver plants, either following transmission by different aphids that fed on the different sets of plants (parallel) or by the same aphid which fed sequentially on the different plants (sequential). In the latter case we also looked at how temporal spacing of the sequential acquisitions affected the probability of complete genome reconstitution. Our results show that it is indeed possible to reconstitute the whole genome, even though this is less likely as the sequential acquisitions are distant in time. Our findings thus support the hypothesis that multipartite viruses may circumvent the genomic integrity maintenance cost during host-to-host transmission because concomitant transmission of all genomic segments is not necessary.

b. Materials and methods

i. Virus isolate, clones and plant agroinoculation

FBNSV is composed of eight genomic segments, each encoding for one protein. Segment C encodes the cell cycle-linked protein (clink), M encodes the movement protein (MP), N encodes the nuclear shuttle protein (NSP), S encodes the coat protein (CP), R encodes the master replication-associated protein (M-Rep), and U1, U2, and U4 encode proteins of unknown functions. The isolate discovered on faba beans (*Vicia faba*) in Ethiopia (**Franz et al. 1997**) and characterized by (**Grigoras et al. 2009**) was inserted as a head-to-tail dimer into the binary plasmid pBin19 to create one plasmid by segment that together reconstitute the FBNSV infectious isolate. (**Grigoras et al. 2018**) observed the impact on plant infection and plant-to-plant transmission of the absence of any of the segments. They showed that it was possible to infect plants when one of segments C, N, U1, U2 or U4 was missing. They further found that the absence of segments C or U4 did not affect virus accumulation and transmission while the absence of U1 or U2 decreased symptom severity and virus titer. They also established that the absence of the N segment impedes plant-to-plant transmission, even though it does not seem to affect within-plant viral growth.

In this study we agro-inoculated ten-day-old faba bean plantlets (*Vicia faba* cv. Sevilla; Vilmorin) with FBNSV-C, FBNSV-N or FBNSV-U4 solutions that respectively correspond to solutions including *Agrobacterium* clones carrying seven of the eight segments of the FBNSV in equal proportions but without the C, N or U4-segment-clones, respectively. Plants were maintained as previously described in (**Di Mattia et al. 2020**). Plant infection was controlled by total DNA extraction and qPCR (see below) 21 days after the agro-inoculation. Even though we were able to obtain relatively many infected plants through agro-inoculation of FBNSV-N and FBNSV-U4, respectively 96/188 (=51.06%) and 94/178 (=52.81%), we obtained only 56/428 (=13.08%) infected plants with FBNSV-C.

ii. Aphid transmission

For all experiments we used aphid colonies of *A. pisum* clone 210 maintained in a controlled chamber as previously described in (**Di Mattia et al. 2020**). Transmission tests were made under similar conditions using faba beans as host plants.

We tested whether the complete virus genome could be reconstituted if: (i) different aphids fed on different (sets of) plants carrying incomplete infections missing different segments came together on the same recipient plant, a mode we hereafter call 'parallel'; (ii) the same aphid, sequentially fed on different (sets of) plants carrying incomplete infections missing different segments, could transmit all the viral segments to the same recipient plant, a mode we hereafter call 'sequential'. Subsequently we asked whether sequential transmission could successfully reconstitute the complete viral genome if the sequential feedings were separated in time (from 0 up to 3 days). Finally, we tested that the reconstituted complete genomes were successfully transmitted.

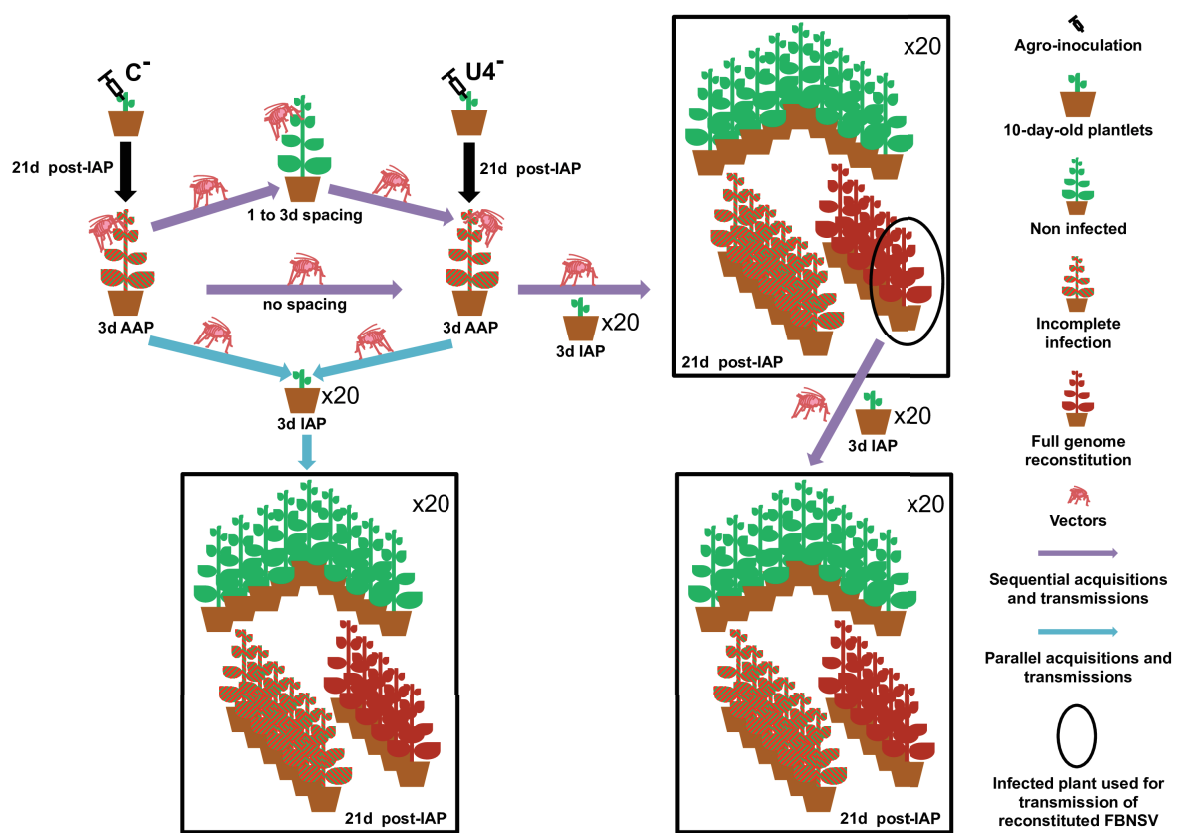


Figure 1. Schematic of the experimental design of "parallel" and "sequential" acquisition/transmission tests.

(i) Parallel vs. sequential acquisition/transmission

In a first experiment we tested whether the complete genome could be reconstituted through parallel or sequential transmission and at which rate. For the parallel transmission test (Figure A, blue arrows), two FBNSV-C and two FBNSV-U4 plants, one of each per replicate, were used as donors and 40 aphids were placed on each plant. Aphids fed on plants during an acquisition access period (AAP) of 3 days to acquire the respective set of segments. Then, we took one aphid from each donor plant and placed one aphid on two different

leaflets of a recipient plant in a “clip-cage” (cage allowing to maintain aphids on one leaflet) during an inoculation access period (IAP) of 3 days.

For sequential transmission, we used the same donor plants and further tested whether the order of acquisition of the different incomplete infections affected the probability of complete genome reconstitution. Thus for each condition 40 aphids were placed on each donor plant for the first acquisition step. Then, we directly transferred aphids on the plants for the second acquisition step with the complementary set of segments. Each AAP step lasted 3 days. Finally, aphids were individually transferred in a clip-cage on one leaflet of a receiver plant (one aphid/receiver) during an IAP of 3 days.

Because transmission does not occur in the absence of segment N (**Grigoras et al. 2018**), which is thus considered to code for a transmission helper in this virus (**Froissart, Michalakis, et Blanc 2002**), for the parallel transmission mode we used only incomplete infections lacking either segments C or U4. For the sequential transmission mode we used the following combinations: (1) FBNSV-C then FBNSV-U4, (2) FBNSV-U4 then FBNSV-C, (3) FBNSV-N then FBNSV-U4 and (4) FBNSV-U4 then FBNSV-N. The third combination allowed to test whether successful transmission of segments can occur even if the N segment, which is necessary for aphid host-to-host transmission, is not acquired during the first but during the second acquisition.

The number of receiver plants per transmission mode and replicate are given in Table 1. All replicates for both transmission modes were conducted at the same time.

(ii) Sequential acquisition/transmission spaced in time

We subsequently tested whether the reconstitution of the complete viral genome could occur if the two sequential acquisitions were spaced in time.

For this experiment (Figure A, purple arrows), 200 to 250 aphids by segment combination (1 to 4) were placed on one donor plant infected by the first set of segments of the combination. Then, 40 aphids were transferred on one donor plant infected by the complementary set of segments. When the two sequential acquisitions were not spaced in time (0 days) the transfer occurred immediately after the end of the first AAP period. The remaining aphids

were placed on a healthy plant. Every 24 h, up to a maximum spacing of 3 days, 40 aphids were taken from the healthy plant and placed on a donor plant infected by the complementary set of segments. Each AAP lasted 3 days. Finally, at the end of the second AAP, aphids were individually placed in a clip-cage on a leaflet of a receiver plantlet during an IAP of 3 days.

Two replicates were conducted for each combination and spacing time (see **Table 1**). However, because the number of plants involved was very large, we first conducted one replicate with all segment combinations and spacing times, and two weeks later, the second replicate.

For experiments (i) and (ii) IAP were stopped with a spray of insecticide (Pirimore – Certis) except where otherwise mentioned. For both experiments, 21 days after the end of the IAP, total DNA of symptomatic plants was extracted and qPCR was performed to test for the presence of segments C, N and U4 (see qPCR details below).

Table 1. Number of inoculated plants for each experiment, transmission mode, combination and replicate. Median/mean sample size = 21/21.5

		Number of inoculated plants																	
Experiment		(i)								(ii)									
Transmission mode		Parallel				Sequential				Sequential									
Combinations		1		2		3		4		1		2		3		4			
Spacing time (days)	Replicate	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b		
0		20	23	20	23	21	21	22	20	22	22	22	21	21	20	21	21	23	
1												20	24	22	20	21	20	21	24
2												23	21	23	22	22	22	20	21
3												17	20	21	24	23	22	23	22

Combinations:

- (1). Aphids fed on FBNSV-C (plants without segment C) infected plants and then on FBNSV-U4 (plants without segment U4) infected plants
- (2). Aphids fed on FBNSV-U4 infected plants then on FBNSV-C infected plants
- (3). Aphids fed on FBNSV-N (plants without segment N) infected plants then on FBNSV-U4 infected plants
- (4). Aphids fed on FBNSV-U4 infected plants then on FBNSV-N infected plants

(iii) Transmission of the reconstituted complete FBNSV genome

To verify if the reconstituted complete FBNSV infections can be transmitted to other plants, we used the plants of the sequential experiment with 1 or 2 days of time spacing. At the end of the IAP of the second replicate, plants were not treated with the insecticide solution. Instead, all aphids were individually removed from the plants and a spray of water and “savon de Marseille” (approximately 1 weight/volume concentration) was applied on the plants to eliminate potentially remaining aphids. We allowed for 21 days of disease progression during which plants were isolated to avoid any aphid contamination. After this period one plant from each combination with the reconstituted complete FBNSV genome (controlled by qPCR) was used as donor for the transmission of the reconstituted virus. Only the 1 day spacing treatment presented at least one plant of each combination with the reconstituted complete FBNSV. Forty aphids were placed on one donor plant from each combination. After an AAP of 3 days one aphid was placed on each of 20 to 24 plantlets for an IAP of 3 days. Finally, 21 days after the end of the IAP of the receiver plants total DNA of symptomatic plants was extracted and the presence of segments C, N and U4 was quantified by qPCR.

iii. Viral DNA extraction and quantitative PCR (qPCR) Detection

Total DNA extraction of plants was performed as described in (Di Mattia, Ryckebusch, *et al.* 2020). FBNSV infection causes faba bean leaf rolling and plant stunting in the early stage of infection, and chlorosis and necrosis in the late stage of infection. We extracted DNA from all plants showing some signs of leaf rolling and stunting and tested for the presence of segments C, N or U4. On the two upper leaf-level of symptomatic faba beans, three leaf discs of 0.6 cm diameter were squashed on Whatman paper. Then, we deposited 100 μ L of modified Edwards buffer (200mM Tris - HCl pH 7.5, 25 mM EDTA, 250 mM NaCl, 0.5% SDS, 1% PVP40, 0.2% ascorbic acid) onto the filter of 200 μ L micropipette tips and the Whatman paper disc was added individually on tips. Samples were centrifuged, at 5000 g for 15 s, into a PCR plate placed underneath. Finally, we precipitated the DNA with isopropanol and washed the sample once with 70% EtOH before resuspending it in 50 μ L of distilled water.

For the qPCR quantification of the C, N and U4 segments, each sample was diluted 10 times in distilled water. We used the LightCycler 480 thermocycler (Roche, Indianapolis, Ind, USA) using 2 μ L of total DNA extract. We used the LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR Green I kit (Roche) according to the manufacturer’s instruction. For each sample, we

added 5 μL of the 2X qPCR Mastermix, 0.3 or 0.5 μM primers (0.3 μM final for segment C and 0.5 μM for segments N and U4 – specific primers of FBNSV segments were described in (Di Mattia *et al.* 2020), complemented at 8 μL with H_2O . Two μL of DNA sample were added to a final mix of 10 μL . All samples were analyzed with two technical replicates. Forty qPCR cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 10 s and 72°C for 10 s were applied to the samples. Post-PCR data analyses were carried as described (Gallet *et al.* 2017).

Because the goal of this study is to investigate whether complete infections can be reconstituted from incomplete infections, we need to define values of Ct, the number of cycles needed to reach the fluorescence threshold, beyond which a segment can be considered as absent. Indeed, it is possible in principle to obtain some amplification with the primers of a segment even when it is absent if the primers can hybridize at a low rate with other segments. In order to establish threshold Ct beyond which each of segments C, N or U4 could be considered with confidence as absent we performed qPCRs on samples of plants which were agro-inoculated with all FBNSV segments but the focal one. To this end; we agro-inoculated 44 to 48 plants with FBNSV-N or -U4 and 65 to 72 plants with FBNSV-C, following the procedures described earlier. These plants were grown for 21 days in growth chambers under a 13/11-h day/night photoperiod at a temperature of 26/20°C. The total DNA of plants was then extracted and the presence of segments C, N and U4 was controlled in each plant through qPCR. We could thus obtain the amplification level produced by the primers of a segment from plants in which the segment was absent. We then calculated for each segment the lower tolerance threshold such that 95% of potential future samples would have higher values with a 95% probability. These thresholds were 30.86, 30.96 and 28.35 for segments C, N and U4 respectively.

iv. Preparation of aphid midguts and Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

We previously showed that the eight segments of FBNSV co-localized in cytoplasmic polarized aggregates around the nucleus in the anterior midgut (AMG) cells of their aphid vectors *A. pisum* (Di Mattia *et al.* 2020). To observe if the sequential acquisition of two segments yields the same result or not, we specifically labeled the pairs of sequentially acquired segments (segment-C and -U4 or -N and -U4) in the AMG cells of their vector. An eventual co-localization of the two sequentially acquired segments would indicate that genome reconstitution occurs already in aphids.

Organ preparation and labeling were performed as described in detail in (**Di Mattia et al. 2020**). Briefly, because 3 days of AAP do not allow for sufficient accumulation of viruses into the AMG, aphids were placed on plants during 7 days for the first and the second acquisition steps. After the first AAP, aphids were placed on healthy plants in order to purge viral particles from their gut; in order to limit potential depletion of the first set of segments this purge was limited to a single day. The second AAP was followed by a 24 h purging period feeding on water through a Parafilm membrane to eliminate the virus present in the lumen of the AMG, after which aphids were dissected. AMGs were recovered in 1X phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4) and fixed, for 20 min, in 4% paraformaldehyde (PFA) prepared in 1X PBS. To stop the fixation reaction AMGs were incubated in 0.1 M glycine, pH 7.4 for 15 min. Organs were washed twice (10 min each) in 1X PBS and an additional incubation in 30 % H₂O₂ solution for 20 min was performed to discolor AMGs and improve the posterior FISH treatment. Finally, AMGs were kept in 1X PBS at 4°C until used for maximum storage times of 3 weeks.

FISH was performed with the fluorescent probes specific to segments C, N or U4 prepared as described in (**Vernerey et al. 2019**). Amplified coding sequences of segments C and N were labeled with Alexa fluor 568 (red) and those for segment U4 were labeled with Alexa fluor 488 (green). Dissected AMGs kept in 1X PBS were washed three times (5 min each) in hybridization buffer (20 mM TrisHCl, pH 8 0.9 M NaCl, 0.01% SDS and 2.7 M of Urea), before an overnight incubation at 37°C with the segment specific probes (diluted 1/30 in hybridization buffer). Labeling was stopped by three washings (5 min each) in the hybridization buffer and then AMGs were placed in a 1X PBS solution. Samples were mounted on microscope slides in a Vectashield antifade-mounting medium (Vector Laboratories) that contains DAPI and AMGs were observed using the Zeiss LSM700 confocal microscope equipped with a 63X objective. For each image, intensity of red, green and blue signals was adjusted as described in (**Sicard et al. 2019**).

The accumulation of FBNSV DNA was observed in anterior midgut (AMG) cells of 9/16 viruliferous aphids from 1 experiment (Figure 3A), 10/27 viruliferous aphids from 2 experiments (Figure 3B), 6/14 viruliferous aphids from 1 experiment (Figure 3C), 14/34 viruliferous aphids from 2 experiments (Figure 3D)

v. Data analysis

Based on the Ct threshold values defined above, we determined whether each segment was present or absent from each recipient plant. In all cases both technical replicates of each sample were either above or below the threshold.

All asymptomatic plants were considered non-infected. All plants showing symptoms were qPCR processed and if any of the C, N, or U4 segments was present in the sample we considered the plant as infected.

When all three segments were present in recipient plants we considered that a complete infection was reconstituted.

To investigate whether transmission mode (parallel or sequential) affected the probability of reconstitution ($P(R)$) or infection ($P(I)$), we ran GLMMs considering that $P(R)$ and $P(I)$ were binomially distributed with logit-distributed errors, transmission mode and segments involved as fixed factors, and experimental replicate as a random factor. Purge time was added as a covariate where relevant. We used the lme4 function in R to run these analyses. Figures were drawn using JMP 13.

We had only two replicates per experimental condition (transmission mode; segments involved; order) and these differed for their donor plants. They also differed for their dates, and in our experimental settings environmental factors linked to the dates can affect $P(I)$. For all these reasons it could be considered reasonable to treat experimental replicates as fixed, instead of random, factors. We thus also performed all analyses using GLMs instead of GLMMs and in all cases reached similar conclusions (results not shown).

c. Results

- i. FBNSV infection and reconstitution is possible through both parallel and sequential acquisition and transmission.

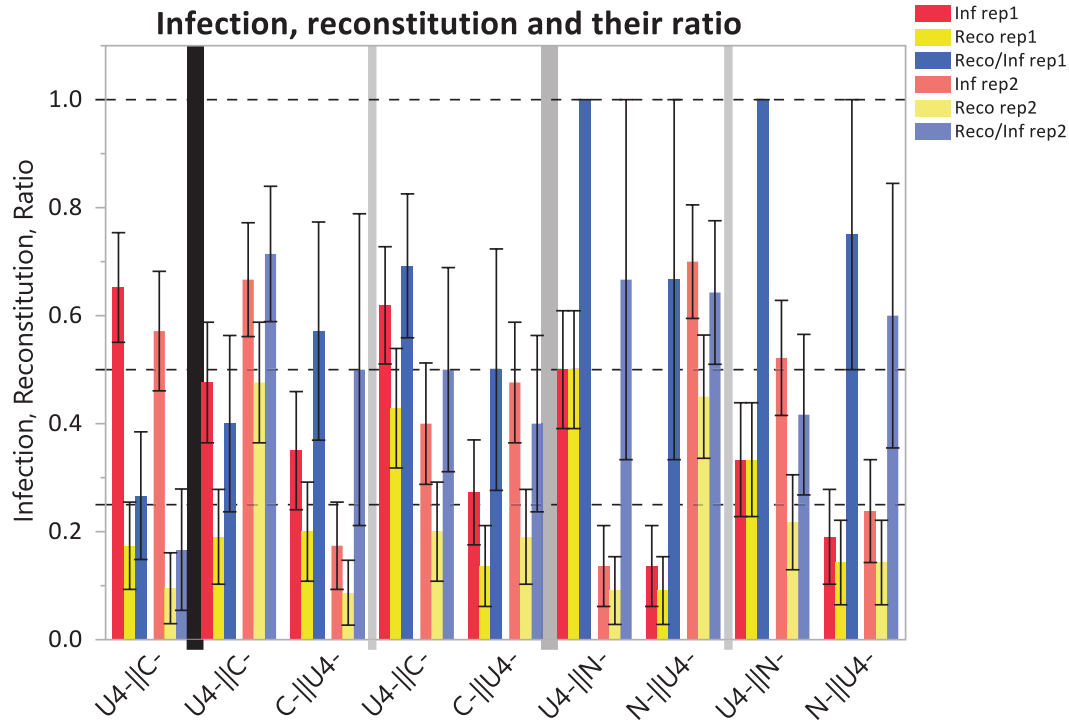


Figure 2. Proportion of infected plants (red), plants where all three segments are found (reconstitution, yellow) and their ratio as a function of the transmission mode (parallel, left of the thick black vertical line; sequential, to the right of this line) and the segments involved (parallel: only U4 and C; sequential: either U4 and C, left of the thick grey line; or N and U4, right of the thick grey line).

For sequential transmission and for a given pair of segments and order, we provide the results from the two different experiments, “parallel vs sequential” and “sequential with spacing in time” respectively to the left or right of the thin vertical grey lines, using for the latter only the 0 spacing time treatments. Dark and pale bars represent the two experimental replicates for each case, and the error bars are ± 1 s.e. of the mean. Dashed horizontal lines were placed at 0.25, 0.5 and 1.0 to facilitate reading the figure.

Figure 2 presents the proportions of infected plants, of plants where the complete FBNSV genome was reconstituted (all segments present) and their ratio, for all conditions and replicates without any temporal spacing between sequential acquisitions. It is possible to make a number of observations from this figure.

All conditions generated infections and reconstitutions. The reconstitution of the complete FBNSV genome is thus possible from ‘viable’ incomplete infections, whether these are transmitted separately by different aphids (parallel transmission) or by the same aphid which acquires them sequentially. This establishes the proof of principle of the main goal of this study.

In all replicates/conditions but two, some infections did not result in the reconstitution of the full genome complement: the proportion of reconstitution (yellow bars) was lower than that of infection (red bars). Some segments are missing in some cases. We discuss this in more length in a separate section.

Sequential transmissions, to the right of the thick black vertical line, performed by a single aphid, led, over all conditions and replicates, to approximately 40% infection, compatible with what we previously found when transmitting the full genome with one aphid (**Gallet et al. 2018**). Parallel transmissions, to the left of the thick black vertical line, performed by two aphids, led to approximately 60% infection; this is very close to 64%, the proportion expected if each aphid had a 40% chance to transmit the infection and there was no interaction between them.

Sequential transmissions, however, led to roughly twice as many reconstitutions of the complete genome formula than parallel transmissions. The 'grand mean' of the proportion of reconstitutions for the latter is 13.6% while it is of the order of 25% for sequential transmissions, whether we calculate this mean over both experiments or only the "parallel vs sequential" experiment, or whether we calculate it over both pairs of segments or only over C/U4 which ate the only segments involved in the first experiment. This difference in reconstitution proportions leads to a similar difference in the reconstitution/infection ratios (blue bars in figure 2): while only 22% of infections result into a complete genome reconstitution under parallel transmission, about two thirds of infections on average result into a reconstitution under sequential transmission.

Do the segments involved in the incomplete infections and their order of acquisition matter? Looking at the situations involving segment C and U4, we can see that, despite variation among replicates, overall there were more infections and reconstitutions when segment C was acquired first (i.e. the "U4-||C-" treatments): across both experiments and replicates "U4-||C-" led to ~54% infections and ~32% reconstitutions vs. ~31% infections and ~15% reconstitutions when C was acquired second ("C-||U4-").

It is highly remarkable that infections occurred when segment N was not acquired during the first acquisition (i.e. the "N-||U4-" conditions). Indeed, no transmission occurs from plants lacking segment N (**Grigoras et al. 2018; Di Mattia et al. 2020**), which is thus considered to code for the helper of FBNSV (**Grigoras et al. 2018**). We comment on this more extensively in the Discussion. For the moment we note that, even though more variable between replicates, transmissions involving segments N and U4 led to similar proportions of infection and reconstitution as transmissions involving segments C and U4. Concerning the order of

acquisition, the results of the first experiment did not show a clear difference between acquisition orders but a sharp contrast between replicates of the same acquisition order (histograms between the thick grey vertical line and the thin grey vertical line to its right). In the contrary, results of the second experiment (to the right of the rightmost thin grey vertical line) showed more infection and transmission when segment N was acquired first (“U4-||N-”) than second (“N-||U4-”). We conclude that if the order of acquisition of segment N has an effect, it is not a major effect.

- ii. FBNSV infection and reconstitution when sequential acquisition by aphids is spaced in time

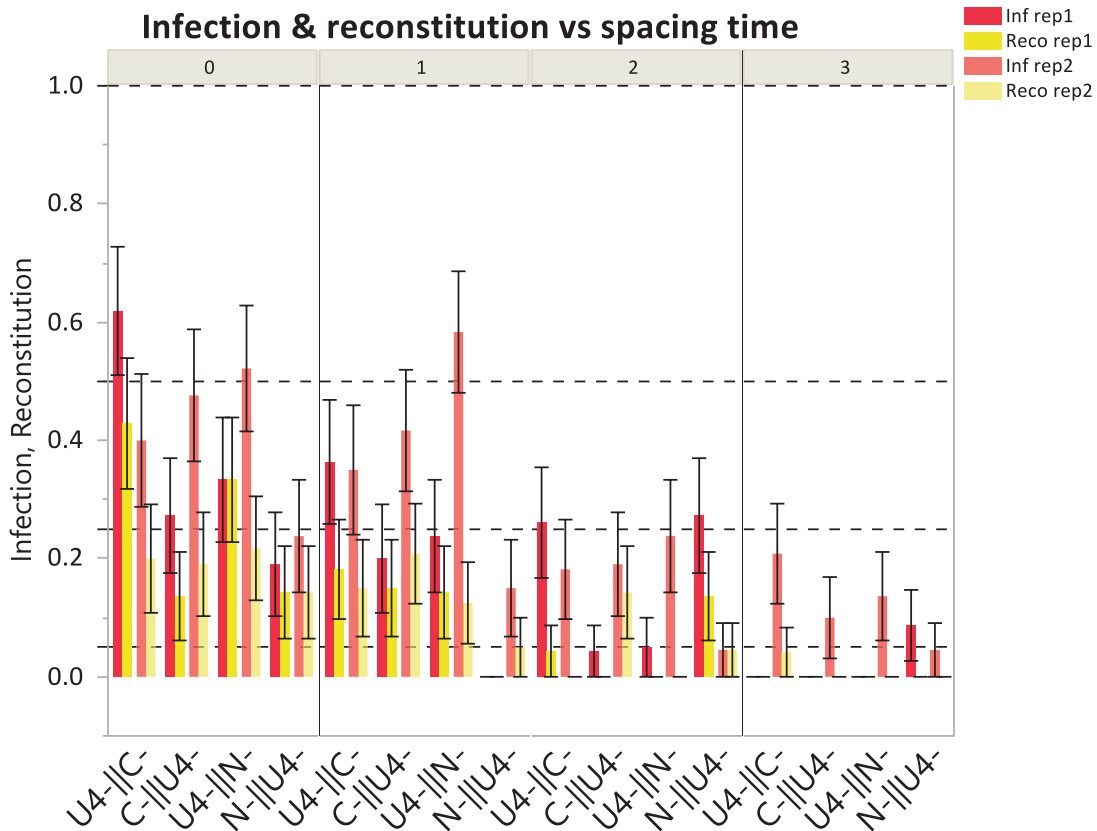


Figure 3. Proportion of infected plants (red) and plants where all three segments are found (reconstitution, yellow) as a function of time spacing (top x-axis) for the different segment and order combinations.

Dark and pale bars represent the two experimental replicates for each case, and the error bars are ± 1 s.e. of the mean. Dashed horizontal lines are placed at 0.05 (roughly 1 individual), 0.25, 0.5 and 1.0 to facilitate reading the figure. Sample size varies from 17 to 24 (see table 1).

Figure 3 presents the proportion of infected plants (red) and plants with the full genome reconstituted (yellow) when segments were acquired sequentially but with variable spacing in time. The figure clearly shows that spacing in time rapidly decreases both infection and reconstitution proportions. To illustrate this, consider that with no spacing (0d) across all segment combinations and replicates 65 plants were infected and 38 had the full genome reconstituted out of a total of 170 receiver plants, while after 3d spacing only 13 plants were infected and only one had a reconstituted genome over a total of 174 receiver plants. Most of infection and reconstitution occurred with no spacing or with just one day, while very little of both occurred with more than one day of spacing.

Because of this, quantitative comparisons between involved segments and their order of acquisition are meaningful only when time spacing is absent or just one day; the number of infected plants and plants with reconstitution of the viral genome is too small otherwise.

Concentrating on these two spacing times the patterns foreseen in the previous section were more or less confirmed: for segments C/U4, infection and reconstitution were higher when C was acquired first without spacing, and occurred at roughly equal rates for both acquisition orders with one day of spacing. For N/U4 segments, more infection and reconstitution occurred when N was acquired first both without spacing and with one spacing day, though, remarkably, infection and reconstitution occurred at significant levels even when N was not acquired first.

iii. Incomplete reconstitution and segment losing.

As mentioned earlier many infections did not result in the reconstitution of the complete FBNSV genome, implying that they were missing at least one segment. Here we investigate this issue in more detail. To this end we first look at the replicates of the two experiments without any time spacing, and then look at the replicates that allowed us to investigate the effect of time spacing under sequential transmission. It is worth noting that very few plants lacked two segments: throughout all our treatments out of a total 250 infected receiver plants two lacked both C and N, two lacked both N and U4, and 19 lacked both C and U4.

Among the 385 receiver plants used in all segment combinations and transmission mode treatments, 158 were infected. Only three of those did not carry segment N: one plant in a “U4-||C-”, one in a “C-||U4-” and one in a “N-||U4-” treatment, all in the second experiment. The first two cases imply that the segments initially lacking in the donor incomplete infections were actually both present in the receiver plant, but that reconstitution of the complete genome had not occurred because of the surprising absence of the N segment. In any case, these results indicate that segment N is rarely involved in incomplete or failed reconstitutions. Segment C was absent from 22/158 (=14%) infected plants and there was no clear pattern in the distribution of these cases, either between transmission modes or across segments involved (results not shown). Segment U4 was absent from 52/158 (=33%) infected plants. It was particularly absent from recipient plants of the parallel transmission mode, where only 10/27 (=37%) infected plants carried it. In contrast, it was much more present in all sequential transmission mode treatments (96/131 infected plants, i.e. 73%), with no strong pattern across segments involved (49/72 = 68% in treatments involving segments C and U4 vs 47/59 = 80% in treatments involving segments N and U4).

Time spacing had no effect on segment N which was present in all infected plants except for the plants mentioned above plus one plant in a “U4-||C-” 1d time-spacing and one plant in a “U4-||N-” in a 2d time-spacing replicate. Segment C was present in ~80% of infected plants for all time-spacing intervals except for 3d where it was present in only 6/13 infected plants. Segment U4’s presence gradually declined with time-spacing interval, being present in 49/65 (75%) infected plants at 0d spacing, to 26/51 (51%) at 1d, 10/28 (36%) at 2d and 5/13 (38%) at 3d. No clear pattern could be observed across segments involved (results not shown).

- iv. Under sequential acquisition reconstitution may occur already in aphids

For segments C and U4, when U4 was acquired first (i.e. “C-||U4-” treatment), very few aggregates containing U4 (in green) were observed compared to the number of aggregates containing C (in red; Figure 3A). Moreover, a majority contained only one of the two segments, very few aggregates showing co-localization of the two segments (Figure 4A white arrows). In contrast, when C was acquired first (“U4-||C-”), a large proportion of the aggregates contained both segments (Figure 4B).

For segments N and U4 we observed a perfect co-localization in all aggregates (Figure 4C and D) for both acquisition orders ("U4-||N-" or "N-||U4-"). All the controls of these experiments, shown in figure S1, demonstrate the specificity of the probes used (Figure S1; "Without C" and "without U4" part). When segments C/U4 and N/U4 were acquired in the same time they showed perfect co-localization (Figure S1; All segments part). Finally, in the absence of the helper factor (segment N) segment U4 was not detected (Figure S1; Without N part).

These results thus demonstrate the possibility to reconstitute the complete FBNSV already in the aphid vectors.

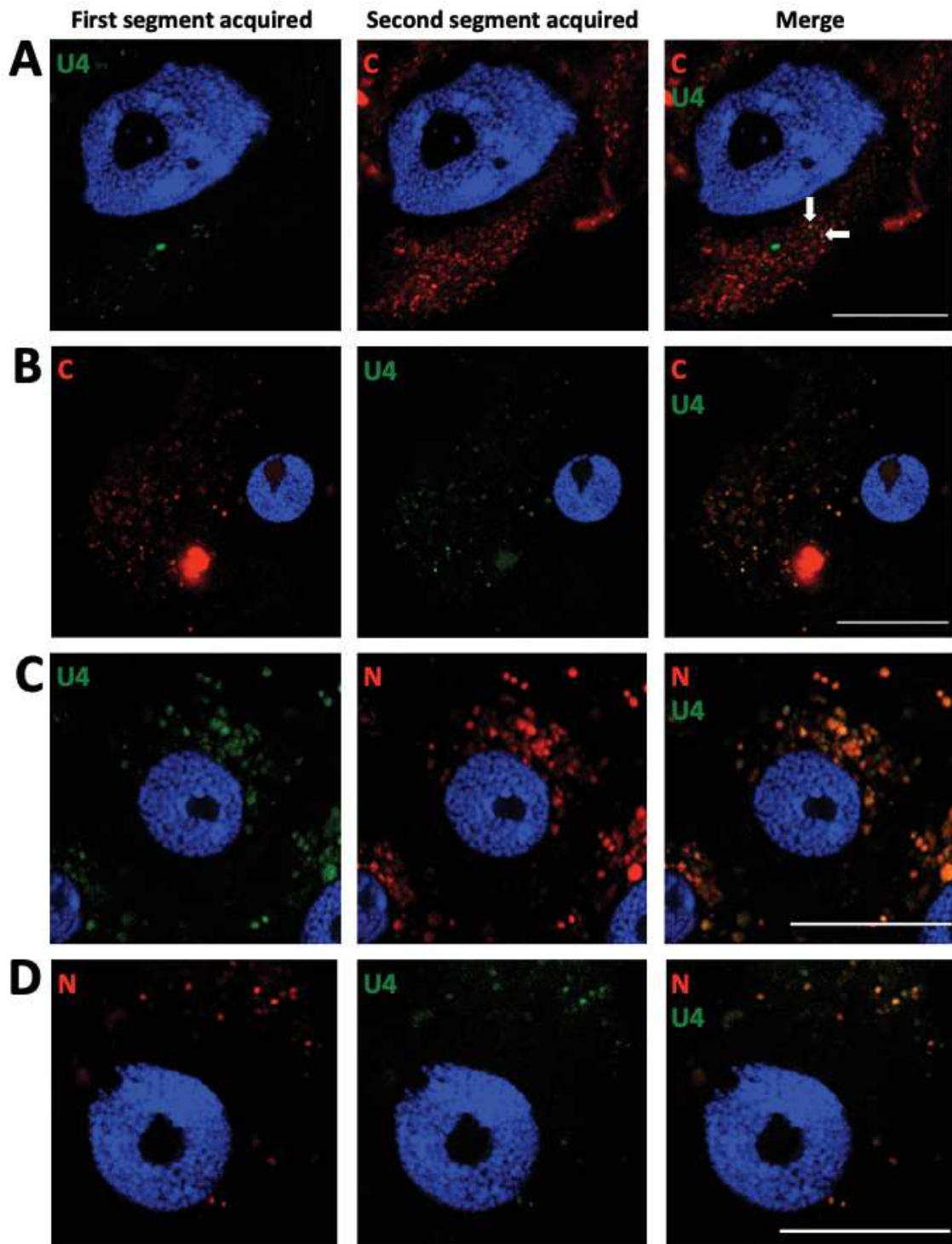


Figure 4: localization of sequentially acquired DNA segments of FBNSV in aphid anterior midgut (AMG) cells.

Viral DNA is labeled by FISH in the AMG cells of viruliferous aphids. The green probes target segment U4 and the red probes target either C or N in the corresponding panels. A representative image of each case is shown to illustrate each result. Panels A to B and C to D represent the sequential acquisition of segments C/U4 and N/U4 in both orders of acquisition, respectively. The white arrows show two aggregates containing both C and U4 segments. All images correspond to single optical sections. Cell nuclei are stained with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole; blue). The scale bar represents 25 μm .

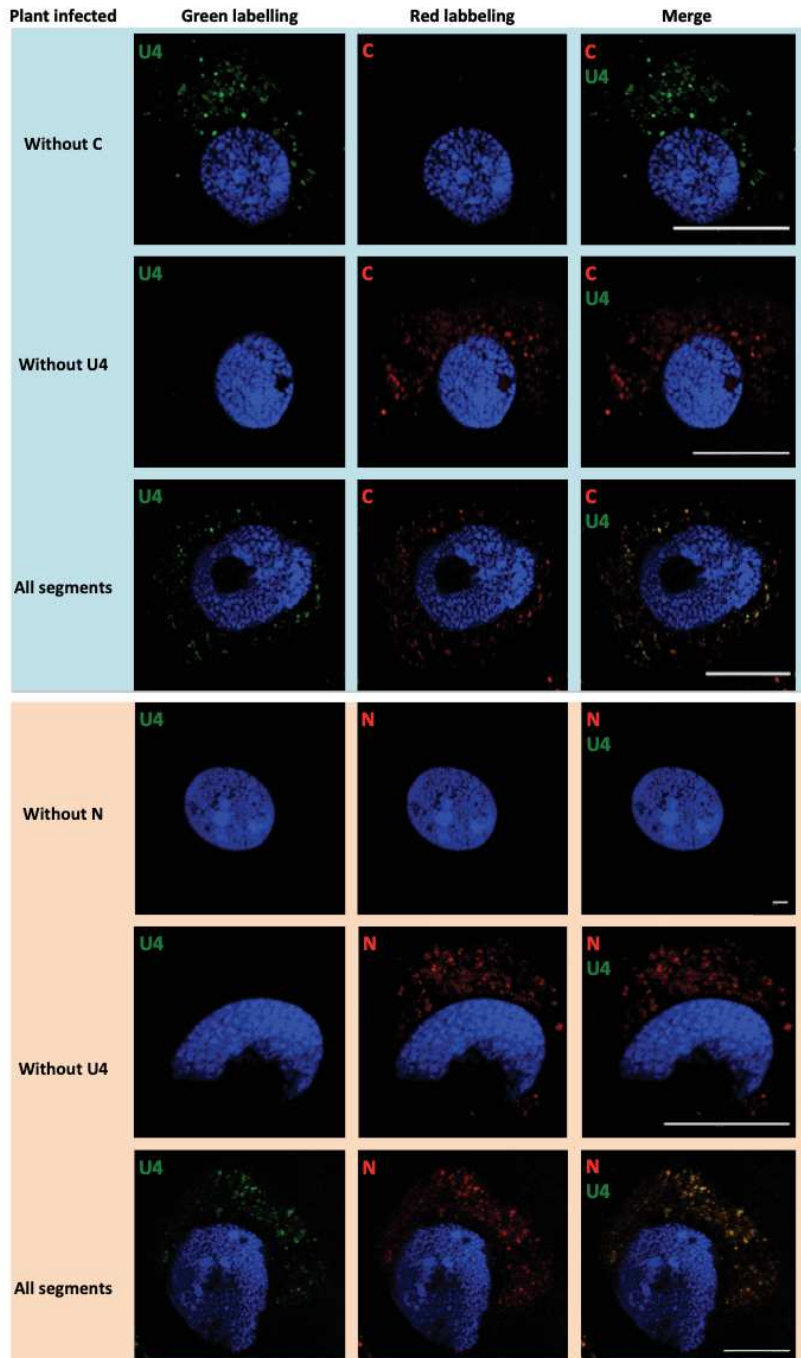


Figure S1: localization of FBNSV segments in aphid AMG cells. Viral DNA is labeled by FISH in the AMG of viruliferous aphids.

The green probes target segment U4 and the red probes target either C or N in the respective panels. Each panel corresponds to the control experiment of C/U4 (light blue part) and N/U4 (light orange part) of figure 3. The “without C”, “without N” or “without U4” panels correspond to the controls of probe specificity. The “All segments” panels show the localization of C/U4 or N/U4 during synchronous acquisition. In the C/U4 (light blue) part, the accumulation of FBNSV DNA was observed in AMG cells of 18/26 viruliferous aphids from 2 experiments (Without C), 10/16 viruliferous aphids from 1 experiment (Without U4), 23/23 viruliferous aphids from 2 experiments (All segments). In the N/U4 (light orange) part, the accumulation of FBNSV DNA was observed in AMG cells of 0/20 viruliferous aphids from 2 experiments (Without N), 13/15 viruliferous aphids from 1 experiment (Without U4), 26/26 viruliferous aphids from 2 experiments (All segments). All images correspond to single optical sections. Cell nuclei are stained with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole; blue). The scale bar represents 25 μm .

- v. The reconstituted virus can be transmitted and infect

Over all treatments we obtained 28/77 (=36.36%) successful transmissions of reconstituted infections, which is close to what we typically observe for transmissions by a single aphid under our experimental conditions. There was variability among treatments, at least partially reflecting the relatively small sample sizes ("U4-||C-": 10/22 (45.45%); "C-||U4-": 5/16 (31.25%); "U4-||N-": 10/20 (50%); "N-||U4-": 3/19 (15.79%)).

In the 28 infected plants, we observed the absence of one or two segments in only 2 plants: segment U4 was absent from one plant of the "U4-||C-" treatment and segments C and N were both absent from one plant of the "C-||U4-" treatment.

These results thus confirm that the reconstituted FBNSV can successfully be transmitted.

d. Discussion

Our results clearly show that the reconstitution of the complete FBNSV genome formula through aphid transmission from incomplete infections is possible. This result demonstrates that all FBNSV segments do not need to be transmitted concomitantly, and thus has important implications for our understanding of how multipartite viruses may be coping with the so far assumed cost of a multipartite way of life related to the maintenance of their genomic integrity during host-to-host transmission (**Iranzo et Manrubia 2012; Sicard et al. 2016; Lucía-Sanz et Manrubia 2017b; Gallet et al. 2018; Michalakis et Blanc 2018, 2020**).

We found that genome reconstitution could occur when incomplete infections are transmitted either by distinct aphids, a mode we termed parallel transmission, or by the same aphid sequentially acquiring viral segments from different plants to transmit them together to a receiver plant. These modes represent the two extremes of a continuum; reconstitutions could potentially, and probably most likely, occur in nature through any mixture of these modes.

When transmission is parallel, reconstitution can only occur in the receiver plant. Our results show that the infection levels we observed, ~60%, are compatible with independent transmission of the two incomplete infections by the two aphids that potentially carry them. However, only ~22% of these infected plants ended up with a reconstituted complete genome, the remaining plants lacking either segment C or U4. These segments may be missing either because they were never transmitted, or because they were 'lost' in the receiver plant after their transmission. The former could occur because the aphids which were supposed to transmit them did not acquire them or acquired them but for some reason did not transmit them to the receiver plant. We were constrained in using only one donor plant for each missing segment in each replicate, because of the repeatedly observed difficulty to obtain infected plants without segment C through agro-inoculation. We can thus not exclude 'donor plant' effects, although the two replicates behaved similarly. The loss of segments after transmission cannot be excluded, as we have previously shown that very few viral particles carrying each segment are transmitted from single aphids (**Gallet *et al.* 2018**). Our previous study did not monitor the transmission of segments C and U4, and thus we have no data allowing direct comparison. If 'missing segments' were lost after transmission, we see no obvious reason explaining why segment U4 should be lost more often than segment C, as it is more frequent than segment C both in plants (**Sicard *et al.* 2013**) and aphids (**Sicard *et al.* 2015**). Further, there is no obvious reason for why such post-transmission losses would occur more often with parallel than with sequential transmission, as we observed. Our results on the transmission of the reconstituted genomes indicate that segment loss is much more rare when donor plants have the full genome, suggesting that transmission from plants with incomplete infections may be particular in this respect. This matter thus deserves further investigation.

Sequential transmission without time-spacing led to infection levels in agreement with previous single-aphid transmission results (**Gallet *et al.* 2018**). Reconstitution of the complete genome was much more frequent under this transmission mode: ~50% of infected plants carried all genomic segments, as opposed to only 22% through parallel transmission. The co-localization of the segments acquired sequentially within the aphid gut epithelial cells indicates that under this transmission mode reconstitution occurs, at least to some extent, within the aphid, which must also explain to a large extent the higher reconstitution rate observed under this transmission mode. This probably also explains why segment loss is more rare under sequential transmission.

We found an unexpected order of acquisition effect: more infections and reconstitutions occurred when segment C was acquired first ('U4-||C-' treatment) than second ('C-||U4' treatment). The fact that we only rarely manage to obtain through agro-inoculation infections lacking segment C may suggest that, at least under our conditions, this segment plays an important role which was not revealed in other experimental conditions (**Timchenko et al. 2006; Grigoras et al. 2018**). It is also possible that segment C plays an as yet unanticipated role in FBNSV transmission in the aphids, resulting into higher transmission if it is acquired early.

A much more remarkable result, however, concerns segment N. As previously stated it has been established that the presence of this segment in the infected source plant is mandatory for aphid transmission (**Grigoras et al. 2018**). It is thus considered as the segment producing the transmission 'helper' of FBNSV. All the so far described transmission helpers must be acquired before the viral particles (**Kassanis et Govier 1971a, 1971b; Lung et Pirone 1973; Lu et al. 2019**). Our sequential experiment results, however, clearly demonstrate that this does not have to be the case for the N segment of FBNSV: it is possible to have transmission, successful infection and even full genome reconstitution even if segment N and/or the protein it codes for are acquired after the other segments (i.e. our 'N-||U4-' treatment). This suggests that the segments acquired by the aphid on plants that do not contain segment N 'survive' in the aphid's gut until segment N and/or its protein are acquired during the second acquisition step. The single full genome reconstitution (out of a total of 13 infected plants) we observed with a 3d-spacing shows that this 'complementation' can occur with at a relatively long delay between the two acquisition steps. We have previously shown that when the virus is acquired from plants lacking segment N no viral segment is visible in aphid gut epithelial cells, while when the virus is acquired from plants with all the segments, they all co-localize within gut epithelial cells (**Di Mattia et al. 2020**). Our confocal microscopy results show that the same process occurs during the sequential acquisition: all segments ingested accumulate within gut cells when N and/or its encoded protein are present, whether ingested prior to other segments or later. The specific mechanisms through which the helper of FBNSV acts need further study and characterization. We can note, however, more to the point of this study, that by being able to potentiate transmission of viral segments previously acquired by aphids, this helper allows for a much larger spectrum of possible reconstitutions of the virus' full genome. Consequently, genome reconstitution through sequential acquisition and transmission may

help FBNSV, and potentially other nanoviruses, alleviate the cost of maintenance of genome integrity upon host-to-host transmission.

Our time-spacing results were very surprising. We observed that infection and reconstitution proportions declined as time-spacing increased. FBNSV, as all nanoviruses, is supposed to be transmitted according to the circulating non-propagative mode (**Gaafar et Ziebell 2020**): it is supposed to travel through the aphid's body without replicating in the aphid. Depletion of the first acquired infection during the short time intervals we used is thus surprising (**Watanabe et Bressan 2013**). But what is even more surprising is that in principle the second-acquired infection should lead to successful infections on its own, even if the first infection was depleted, at a rate that in principle should not depend on the time since the first acquisition. This is clearly not what happened in our experiments. One potential explanation could be that the ability of aphids to successfully transmit viral infections decreases with time. As we already noted above, the observations of (**Watanabe et Bressan 2013**) showed that this would be unlikely within the short time intervals we used. An alternative could be that the first acquisition somehow triggers a mechanism which inhibits transmission after the secondary acquisition, and the strength of this inhibitory mechanism would increase with spacing-time between the two acquisitions. Under the perhaps simplest version of this scenario the first acquisition would inhibit the second. We should then observe that the first acquired segment is transmitted more than the second, a sort of superinfection exclusion. However, this is not what we observed, we found no clear pattern as to which segment was missing as a function of acquisition order. Because we would at present lack means to evaluate more complicated scenarios, we leave this very interesting phenomenon to the future investigation it deserves. Such investigations should not only ambition to clarify what happens during sequential acquisitions within aphids, but also within plants. For example, parallel transmissions delayed in time could be performed to see whether analogous phenomena occur. We note for the moment that this unanticipated negative effect of time-spacing between sequential acquisitions undoubtedly limits the potential of reconstitutions to help multipartite viruses overcome the cost linked to genomic integrity upon host-to-host transmission.

In summary, our results demonstrate that the multipartite nanovirus FBNSV can successfully reconstitute its complete genome either through the independent transmission of incomplete infection by different aphids which come together on the same receiver plant, or through the

sequential acquisition of incomplete infections by the same aphid which can then transmit all the segments to a receiver plant. The acquisition of the full FBNSV genome thus does not have to be concomitant. In the introduction we stated that we ‘partly’ address this issue. We used this term because we acknowledge that in the present study we demonstrate that reconstitution is possible between incomplete infections which are viable (even though they do not necessarily perform as well as complete genome infections). The potential of genome reconstitution from partial infections to alleviate the cost of maintenance of genomic integrity would be much larger if it could be shown that such reconstitution occurs for incomplete infections which are not viable on their own. We relegate this to future study.

Our investigation revealed two phenomena that affect transmission and reconstitution potential in opposite ways. Specifically, we found that time-spacing between sequential acquisitions decreases the probability of successful infection, which negatively impacts the reconstitution potential. On the contrary, we found that unlike all other described cases, the helper of FBNSV does not need to be acquired by aphids before the viral particles it helps transmit: it can potentiate transmission, through some currently uncharacterized mechanism, even if it is acquired after the viral particles. This broadens the potential for reconstitution since it does not impose a strict acquisition order for transmission and reconstitution to be successful.

It is currently impossible to quantitatively evaluate the potential of complete genome reconstitution through non-concomitant transmission of different segments to alleviate the host-to-host transmission cost of multipartitism. Such evaluation would require the precise knowledge of ecological and behavioral variables, such as the prevalence and density of infected plants, the density of vectors, how often vectors move from plant to plant, what governs their individual host plant choice, all of which is currently unknown. Our study, however, demonstrates that the concomitant transmission of the different genome components is not mandatory. Thus after showing that multipartite viruses may solve the within-host cost of genomic integrity maintenance through a supra-cellular, distributed, functioning (**Anne Sicard *et al.* 2019**), the present study shows that they may solve the between-host cost of genomic integrity maintenance through a supra-individual host, distributed, transmission.

e. References

- Betancourt, M., A. Fereres, A. Fraile, et F. Garcia-Arenal. 2008. « Estimation of the Effective Number of Founders That Initiate an Infection after Aphid Transmission of a Multipartite Plant Virus ». *J Virol* 82(24):12416–21.
- Di Mattia, J., F. Ryckebusch, M.S. Vernerey, E. Pirolles, N. Sauvion, M. Peterschmitt, J.L. Zeddami, et S. Blanc. 2020. « Co-Acquired Nanovirus and Geminivirus Exhibit a Contrasted Localization within Their Common Aphid Vector ». *Viruses* 12(3). doi: 10.3390/v12030299.
- Di Mattia, J., M. S. Vernerey, M. Yvon, E. Pirolles, M. Villegas, Y. Gaafar, H. Ziebell, Y. Michalakis, J. L. Zeddami, et S. Blanc. 2020. « Route of a Multipartite Nanovirus across the Body of Its Aphid Vector ». *Journal of Virology* 94(9). doi: 10.1128/JVI.01998-19.
- Franz, A., K. M. Makkouk, et H. J. Vetten. 1997. « Host range of faba bean necrotic yellows virus and potential yield loss in infected faba bean ». *Phytopathol Medit* 36:94–103.
- Froissart, R., Y. Michalakis, et S. Blanc. 2002. « Helper Component-Transcomplementation in the Vector Transmission of Plant Viruses ». *Phytopathology*® 92(6):576–79. doi: 10.1094/PHTO.2002.92.6.576.
- Gaafar, Y. et H. Ziebell. 2020. « Aphid Transmission of Nanoviruses ». *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 104(2):e21668. doi: 10.1002/arch.21668.
- Gallet, R., F. Fabre, Y. Michalakis, et S. Blanc. 2017. « The Number of Target Molecules of the Amplification Step Limits Accuracy and Sensitivity in Ultradeep-Sequencing Viral Population Studies ». *Journal of Virology* 91(16). doi: 10.1128/JVI.00561-17.
- Gallet, R., F. Fabre, G. Thébaud, M. T. Sofonea, A. Sicard, S. Blanc, et Y. Michalakis. 2018. « Small Bottleneck Size in a Highly Multipartite Virus during a Complete Infection Cycle ». *Journal of Virology* 92(14). doi: 10.1128/JVI.00139-18.
- Grigoras, I., T. Timchenko, L. Katul, A. Grande-Perez, H. J. Vetten, et B. Gronenborn. 2009. « Reconstitution of Authentic Nanovirus from Multiple Cloned DNAs ». *J Virol* 83(20):10778–87.
- Grigoras, I., H. J. Vetten, U. Commandeur, H. Ziebell, B. Gronenborn, et T. Timchenko. 2018. « Nanovirus DNA-N Encodes a Protein Mandatory for Aphid Transmission ». *Virology* 522:281–91. doi: 10.1016/j.virol.2018.07.001.
- Hu, Z., X. Zhang, W. Liu, Q. Zhou, Q. Zhang, G. Li, et Q. Yao. 2016. « Genome Segments Accumulate with Different Frequencies in Bombyx Mori Bidsensovirus ». *Journal of Basic Microbiology* 56(12):1338–43. doi: 10.1002/jobm.201600120.
- Iranzo, J., et S. C. Manrubia. 2012. « Evolutionary Dynamics of Genome Segmentation in Multipartite Viruses ». *Proc Biol Sci* 279(1743):3812–19.
- Kassanis, B., et D. A. Govier. 1971a. « New Evidence on the Mechanism of Aphid Transmission of Potato C and Potato Aucuba Mosaic Viruses ». *Journal of General Virology* 10(1):99–101. doi: 10.1099/0022-1317-10-1-99.
- Kassanis, B., et D. A. Govier. 1971b. « The Role of the Helper Virus in Aphid Transmission of Potato Aucuba Mosaic Virus and Potato Virus C ». *Journal of General Virology* 13(2):221–28. doi: 10.1099/0022-1317-13-2-221.
- Lu, G., S. Li, C. Zhou, X. Qian, Q. Xiang, T. Yang, J. Wu, X. Zhou, Y. Zhou, X. S. Ding, et X. Tao. 2019. « Tenuivirus Utilizes Its Glycoprotein as a Helper Component to Overcome Insect Midgut Barriers for Its Circulative and Propagative Transmission ». *PLOS Pathogens* 15(3):e1007655. doi: 10.1371/journal.ppat.1007655.

- Lucía-Sanz, A., et S. Manrubia. 2017. « Multipartite Viruses: Adaptive Trick or Evolutionary Treat? » *Npj Systems Biology and Applications* 3(1). doi: 10.1038/s41540-017-0035-y.
- Lung, M. C. Y., et T. P. Pirone. 1973. « Studies on the reason for differential transmissibility of cauliflower mosaic virus isolates by aphids ». *Phytopathology* 63:910-14.
- Michalakis, Y., et S. Blanc. 2018. « Editorial Overview: Multicomponent Viral Systems ». *Current Opinion in Virology* 33:vi-ix. doi: 10.1016/j.coviro.2018.11.009.
- Michalakis, Y., et S. Blanc. 2020. « The Curious Strategy of Multipartite Viruses ». *Annual Review of Virology* 7(1):203-18. doi: 10.1146/annurev-virology-010220-063346.
- Ojosnegros, S., J. Garcia-Arriaza, C. Escarmis, S. C. Manrubia, C. Perales, A. Arias, M. G. Mateu, et E. Domingo. 2011. « Viral Genome Segmentation Can Result from a Trade-off between Genetic Content and Particle Stability ». *PLoS Genet* 7(3):e1001344.
- Sicard, A., M. Yvon, T. Timchenko, B. Gronenborn, Y. Michalakis, S. Gutierrez, et S. Blanc. 2013. « Gene Copy Number Is Differentially Regulated in a Multipartite Virus ». *Nat Commun* 4:2248.
- Sicard, A., Y. Michalakis, S. Gutiérrez, et S. Blanc. 2016. « The Strange Lifestyle of Multipartite Viruses ». *PLOS Pathogens* 12(11):e1005819. doi: 10.1371/journal.ppat.1005819.
- Sicard, A., E. Pirolles, R. Gallet, M. S. Vernerey, M. Yvon, C. Urbino, M. Peterschmitt, S. Gutierrez, Y. Michalakis, et S. Blanc. 2019. « A multicellular way of life for a multipartite virus » édité par F. García-Arenal, D. Weigel, et F. García-Arenal. *eLife* 8:e43599. doi: 10.7554/eLife.43599.
- Sicard, A., J. L. Zeddiam, M. Yvon, Y. Michalakis, S. Gutiérrez, et S. Blanc. 2015. « Circulative Nonpropagative Aphid Transmission of Nanoviruses: an Oversimplified View ». *Journal of Virology* 89(19):9719-26. doi: 10.1128/JVI.00780-15.
- Timchenko, T., L. Katul, M. Aronson, J. C. Vega-Arreguin, B. C. Ramirez, H. J. Vetten, et B. Gronenborn. 2006. « Infectivity of Nanovirus DNAs: Induction of Disease by Cloned Genome Components of Faba Bean Necrotic Yellowing Virus ». *J Gen Virol* 87(Pt 6):1735-43.
- Vernerey, M. S., E. Pirolles, S. Blanc, et A. Sicard. 2019. « Localizing Genome Segments and Protein Products of a Multipartite Virus in Host Plant Cells ». *Bio-protocol* 9(23):e3443-e3443.
- Watanabe, S., et A. Bressan. 2013. « Tropism, Compartmentalization and Retention of Banana Bunchy Top Virus (Nanoviridae) in the Aphid Vector *Pentalonia nigronervosa* ». *J Gen Virol* 94(Pt 1):209-19.
- Wu, B., M. P. Zwart, J. A. Sánchez-Navarro, et S. F. Elena. 2017. « Within-Host Evolution of Segments Ratio for the Tripartite Genome of Alfalfa Mosaic Virus ». *Scientific Reports* 7(1):5004. doi: 10.1038/s41598-017-05335-8.

3. Conclusions et discussions

L'ensemble de nos résultats a clairement montré qu'une reconstitution du nanovirus FBNSV possédant un génome complet est possible en partant de deux sets incomplets, mais complémentaires de segments viraux ayant la capacité d'infecter une plante. Suivant la situation rencontrée, la reconstitution peut intervenir soit dans le puceron soit dans la plante recevant les deux sets incomplets de segments. Cette découverte est primordiale dans notre compréhension du mode de vie multipartite des nanovirus. En effet, il n'est pas nécessaire que tous les segments génomiques soient acquis en même temps ou transmis par un seul puceron pour initier une infection complète chez une nouvelle plante. Une telle observation indique que le FBNSV peut limiter le coût lié au risque de perte d'un segment, coût discuté dans divers articles récents (**Iranzo et Manrubia 2012; Sicard et al. 2016; Lucía-Sanz et Manrubia 2017b; Gallet et al. 2018; Michalakis et Blanc 2018, 2020**).

La comparaison de la transmission des modalités « parallèle » et « séquentielle » a logiquement montré que l'on obtient un taux d'infection des plantes plus important en déposant deux pucerons virulifères sur la même fève au lieu d'un seul. Cependant, de façon inattendue, la reconstitution d'un FBNSV complet est plus souvent observée lorsqu'elle ne fait intervenir qu'un seul puceron. Nous interprétons cette différence dans les taux de reconstitution par le fait que les segments du virus séquentiellement acquis se rejoignent dans les mêmes agrégats dans les cellules de l'AMG leur permettant ensuite d'être inoculés dans la même zone chez la plante.

Dans la transmission « séquentielle », nous avons observé que lorsque le segment C est acquis en premier, le taux d'infection et de reconstitution du virus est plus important que lorsqu'il est acquis en second. Dans nos conditions expérimentales, le segment C semble donc favoriser l'infection de la plante ce qui n'avait pas été mis en évidence dans les travaux précédents (**Grigoras et al. 2018**). Par ailleurs, il ne peut être exclu que le segment C joue également un rôle dans la transmission par puceron, ou que U4 ait un effet négatif sur l'acquisition secondaire, expliquant la baisse du taux d'infection et de reconstitution lorsque le segment C est acquis en second.

Lors de la transmission suivant la modalité « séquentielle », on observe une baisse des taux d'infection et de reconstitution au fur et à mesure que le temps de purge augmente entre les deux acquisitions. Les virus appartenant à la famille des *Nanoviridae* sont transmis de manière circulante non multipliante (**Gaafar et Ziebell 2020**). Il a été précédemment montré que la quantité du BBTv présente dans le vecteur décroît avec le temps lorsque le puceron est mis sur une plante saine (**Watanabe et Bressan 2013**).

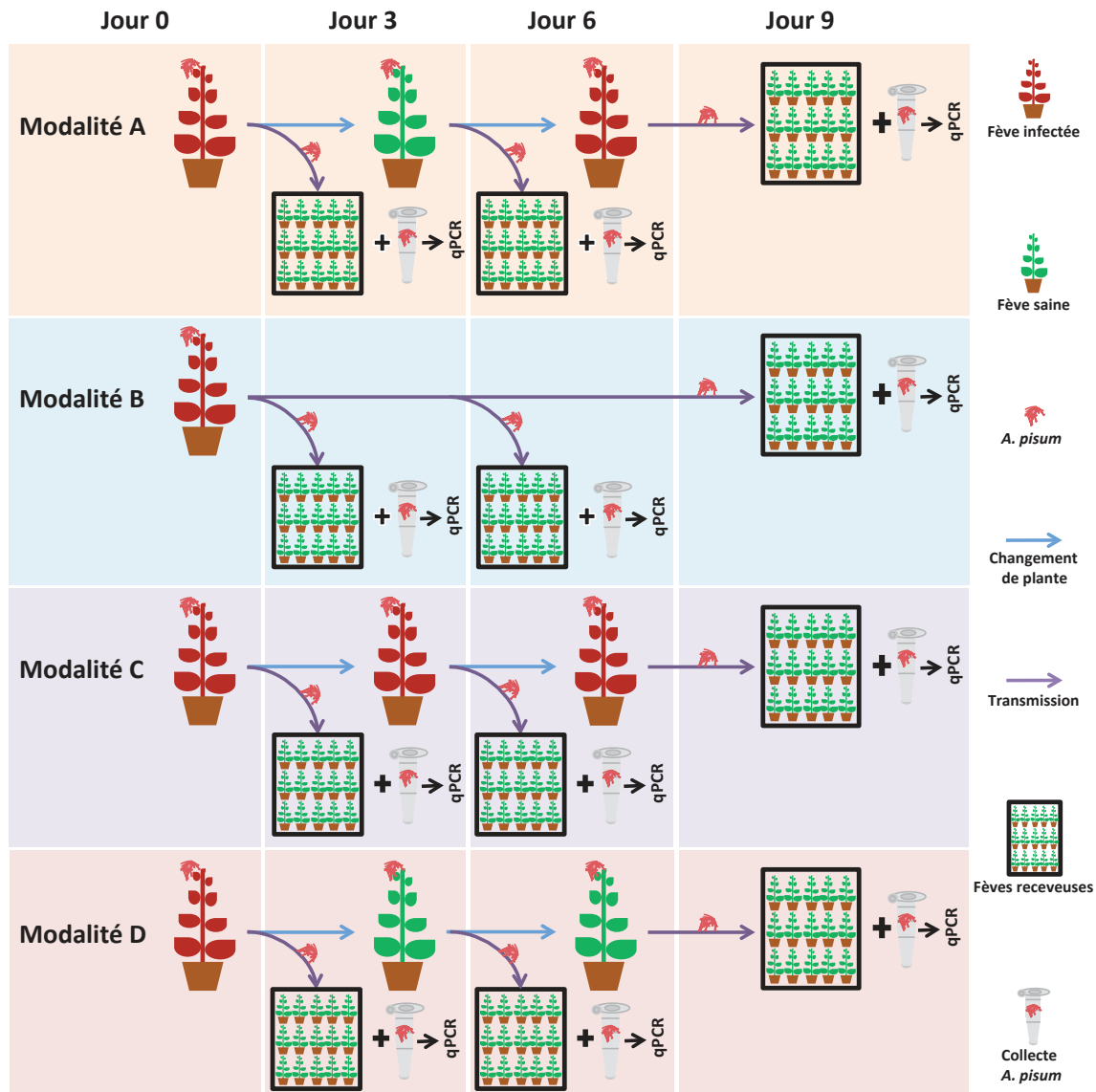


Figure 5. Schéma descriptif des tests de transmission effectués pour la recherche d'un éventuel phénomène de blocage de la seconde acquisition du FBNSV après purge sur une plante saine.

A. Deux acquisitions de trois jours sur plante infectée séparées par une période de purge de 3 jours sur plante saine (Répétition du schéma expérimental réalisé dans la publication de ce chapitre). Cette modalité nous permet d'observer si, lors de la transmission au jour 9, un phénomène de blocage de la seconde acquisition est bien présent chez les pucerons.

B. Contrôle établissant le taux de transmission lorsque les pucerons peuvent acquérir le virus sur une plante infectée sans interruption sur toute la période de 9 jours.

C. Contrôles avec des manipulations/transferts des pucerons équivalents au traitement A. Cette modalité, comparée à A et B, permet de tester l'effet des transferts des pucerons qui pourraient provoquer un stress affectant le taux de transmission.

D. Contrôle avec absence de la deuxième acquisition. Ce traitement doit être comparé au traitement A et permet d'évaluer l'intensité du blocage éventuel de la deuxième acquisition.

Des tests de transmission intermédiaires aux jours 3 et 6 sont effectués dans tous les traitements pour observer et comparer à chaque étape l'évolution des taux de transmission. De plus, des pucerons sont aussi prélevés dans tous les cas aux jours 3, 6 et 9 pour contrôler l'évolution de leur charge virale au cours du temps selon les modalités. Pour finir, au terme de tous les traitements, la présence des 8 segments du FBNSV sera testée par qPCR dans l'ensemble des plantes receveuses symptomatiques pour estimer le taux de perte de chacun.

Cela pourrait expliquer la baisse des taux d'infection et de reconstitution qui s'accroît avec la durée de la purge mais il n'est pas exclu que l'âge du puceron puisse également être un facteur expliquant cette chute. Ces deux possibilités restent peu crédibles dans le cas de notre expérience pour laquelle les différences d'âge entre lots sont réduites (1 à 3 jours). Une hypothèse complètement différente serait que la première acquisition déclenche chez le puceron des mécanismes entraînant une réduction de la transmission après la seconde acquisition, mécanismes qui s'accroîtraient avec le temps séparant les deux acquisitions. La vision la plus simpliste serait que la première acquisition inhibe la seconde, mais ceci devrait alors résulter en une meilleure transmission du premier segment acquis, un phénomène que nous n'avons pas observé. La première question à éclaircir ou confirmer est donc l'efficacité de la deuxième acquisition. Pour ce faire, j'ai réalisé des tests de transmission du FBNSV complet similaires à ceux réalisés dans la publication c'est-à-dire deux acquisitions successives sur plantes infectées séparées par un temps de purge sur plantes saines. Le schéma expérimental est détaillé dans la **figure 5**.

Ayant réalisé cette expérience quelques jours avant la remise de mon manuscrit, les résultats n'ont pas pu y être inclus et seront analysés en détail ultérieurement. Ils permettront de confirmer ou infirmer l'existence d'un mécanisme de blocage de l'acquisition secondaire du nanovirus FBNSV par le puceron *A. pisum*. Dans le cas d'une confirmation non équivoque, de nouvelles voies de recherches sur un phénomène original seraient ouvertes et pourraient être explorées par d'autres membres de l'équipe.

Un résultat marquant dans le domaine de l'interaction moléculaire/cellulaire entre virus et vecteur, est celui concernant le segment N et la protéine NSP pour laquelle il code, le facteur assistant de la transmission. L'ensemble des données précédemment publiées a établi que chez divers groupes de virus, le facteur assistant à la transmission ne peut assurer sa fonction que lorsqu'il est acquis avant le virus (**Kassanis et Govier 1971a, 1971b; Lung et Pirone 1973; Lu et al. 2019**). Cependant, nos expériences avec le FBNSV montrent pour la première fois qu'un facteur assistant de la transmission acquis après les particules virales (illustré par la transmission du segment U4) peut fonctionner. Dans notre cas, il semble que le virus puisse « attendre » plusieurs jours dans l'insecte vecteur l'arrivée du facteur assistant de la transmission. Le virus n'étant pas détectable dans les cellules de l'AMG en l'absence de NSP (**cf. Chapitre 1 et Figure S1 de cette étude**), il est nécessaire d'étudier plus spécifiquement la localisation des particules virales « en attente » dans l'insecte. Nos hypothèses sur un possible nouveau mode d'action pour un facteur assistant de la transmission sont discutées dans le Chapitre 5.

Cette étude a permis de mettre en lumière la possibilité de reconstitution d'un virus multipartite complet à partir de deux sets de segments génomiques **viables** incomplets et complémentaires. Des investigations sur la possibilité de reconstituer un virus à partir de sets incomplets **non viables** (c'est-à-dire ne possédant pas des segments essentiels tels que M, R et S ; (**Grigoras et al. 2018**)) permettrait de comprendre jusqu'à quel point ces virus ont développé des mécanismes favorisant leur maintien dans l'environnement. Enfin, le fait que les segments acquis séquentiellement colocalisent dans l'AMG des pucerons ouvre la porte à l'étude de possible réassortiment entre espèces plus ou moins proches de virus multipartite et du rôle prépondérant de la transmission par vecteur dans ce phénomène.

4. Références hors article

- Chao 1992. « Evolution of sex in RNA viruses ». *Trends Ecol. Evol.* 7(5):147-51.
- Di Mattia, J., M. S. Vernerey, M. Yvon, E. Piroles, M. Villegas, Y. Gaafar, H. Ziebell, Y. Michalakis, J. L. Zeddani, et S. Blanc. 2020. « Route of a Multipartite Nanovirus across the Body of Its Aphid Vector ». *Journal of Virology* 94(9). doi: 10.1128/JVI.01998-19.
- Gaafar, Y. Z. A., et H. Ziebell. 2020. « Aphid Transmission of Nanoviruses ». *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 104(2):e21668. doi: 10.1002/arch.21668.
- Gallet, R., F. Fabre, G. Thébaud, M. T. Sofonea, A. Sicard, S. Blanc, et Y. Michalakis. 2018. « Small Bottleneck Size in a Highly Multipartite Virus during a Complete Infection Cycle ». *Journal of Virology* 92(14). doi: 10.1128/JVI.00139-18.
- Grigoras, I., H. J. Vetten, U. Commandeur, H. Ziebell, B. Gronenborn, et T. Timchenko. 2018. « Nanovirus DNA-N Encodes a Protein Mandatory for Aphid Transmission ». *Virology* 522:281-91. doi: 10.1016/j.virol.2018.07.001.
- Iranzo, J., et S. C. Manrubia. 2012. « Evolutionary Dynamics of Genome Segmentation in Multipartite Viruses ». *Proc Biol Sci* 279(1743):3812-19.
- Kassanis, B., et D. A. Govier. 1971a. « New Evidence on the Mechanism of Aphid Transmission of Potato C and Potato Aucuba Mosaic Viruses ». *Journal of General Virology* 10(1):99-101. doi: 10.1099/0022-1317-10-1-99.
- Kassanis, B., et D. A. Govier. 1971b. « The Role of the Helper Virus in Aphid Transmission of Potato Aucuba Mosaic Virus and Potato Virus C ». *Journal of General Virology* 13(2):221-28. doi: 10.1099/0022-1317-13-2-221.
- Lu, G., S. Li, C. Zhou, X. Qian, Q. Xiang, T. Yang, J. Wu, X. Zhou, Y. Zhou, X. S. Ding, et X. Tao. 2019. « Tenuivirus Utilizes Its Glycoprotein as a Helper Component to Overcome Insect Midgut Barriers for Its Circulative and Propagative Transmission ». *PLOS Pathogens* 15(3):e1007655. doi: 10.1371/journal.ppat.1007655.
- Lucía-Sanz, A., et S. Manrubia. 2017. « Multipartite Viruses: Adaptive Trick or Evolutionary Treat? » *Npj Systems Biology and Applications* 3(1). doi: 10.1038/s41540-017-0035-y.
- Lung, M. C. Y., et T. P. Pirone. 1973. « Studies on the reason for differential transmissibility of cauliflower mosaic virus isolates by aphids ». *Phytopathology* 63:910-14.
- Michalakis, Y., et S. Blanc. 2018. « Editorial Overview: Multicomponent Viral Systems ». *Current Opinion in Virology* 33:vi-ix. doi: 10.1016/j.coviro.2018.11.009.

- Michalakis, Y., et S. Blanc. 2020. « The Curious Strategy of Multipartite Viruses ». *Annual Review of Virology* 7(1):203–18. doi: 10.1146/annurev-virology-010220-063346.
- Nee, S. 1987. « The evolution of multicompartmental genomes in viruses ». *J Mol Evol* 25(4):277–81.
- Pressing, J., et D. C. Reaney. 1984. « Divided genomes and intrinsic noise ». *J Mol Evol* 20(2):135–46.
- Sicard, A., M. Yvon, T. Timchenko, B. Gronenborn, Y. Michalakis, S. Gutierrez, et S. Blanc. 2013. « Gene Copy Number Is Differentially Regulated in a Multipartite Virus ». *Nat Commun* 4:2248.
- Sicard, A., Y. Michalakis, S. Gutiérrez, et S. Blanc. 2016. « The Strange Lifestyle of Multipartite Viruses ». *PLOS Pathogens* 12(11):e1005819. doi: 10.1371/journal.ppat.1005819.
- Watanabe, S., et A. Bressan. 2013. « Tropism, Compartmentalization and Retention of Banana Bunchy Top Virus (Nanoviridae) in the Aphid Vector *Pentalonia nigronervosa* ». *J Gen Virol* 94(Pt 1):209–19.
- Wright, J. P., D. B. Fisher, et T. E. Mittler. 1985. « Measurement of the aphid feeding rates on artificial diets using 3H-inulin ». *Entomol. Exp. Appl* 37:9–11.

CHAPITRE 4 : RECHERCHE DE PARTENAIRES CELLULAIRES DES PROTEINES NSP ET CP

1. Mise en contexte

La recherche de « protéines partenaire(s) du puceron » impliquées dans la circulation du FBNSV au sein de son vecteur est nécessaire pour établir les interactions virus-insecte existant au niveau cellulaire. Cette étude permet également d'accroître nos connaissances sur le trajet intracellulaire de ce virus. Comme décrit dans le Chapitre 1, la présence des protéines NSP et CP a été recherchée dans l'AMG et les PSG du puceron. En complément, il est nécessaire de mettre en évidence les potentiels interactants de ces deux protéines virales lors du passage de la première barrière rencontrée par le FBNSV : l'AMG. Pour ce faire, la méthodologie choisie est l'utilisation du système double hybride en levure pour cribler une banque d'ADNc issue d'intestins du puceron vecteur *A. craccivora*. La décision de réaliser une banque d'ADNc venant d'intestin d'*A. craccivora* a été prise parce que l'équipe d'accueil mène parallèlement un programme de recherche sur l'ALCV transmis exclusivement par ce puceron. Les criblages de la banque d'ADNc à l'aide du système double hybride ont été réalisés en collaboration avec Faustine Ryckebusch qui étudiait la transmission de l'ALCV durant sa thèse, une situation favorable déjà mise à profit lors du Chapitre 2. La comparaison des résultats obtenus pour le FBNSV et pour l'ALCV pourrait ainsi permettre des comparaisons intéressantes quant aux gènes du puceron impliqués dans la transmission des nano- et geminivirus.

Cette étude est encore non finalisée et donc non publiée car il manque la validation fonctionnel des protéines candidates identifiées. Après une présentation rapide de la méthode et des résultats, la description de cette partie est formatée comme un manuscrit « en préparation ».

a. Principe général et méthodologie

La recherche d'interactions entre protéines est un processus classique pour caractériser, entre autre, les interactions virus-hôte et/ou virus-vecteur. Une des techniques les plus utilisées est la recherche d'interactions entre deux protéines dans un système hétérologue eucaryote, la levure. Communément appelés double hybride en levure ou yeast two-hybrid (Y2H) en anglais, ces systèmes permettent d'observer si deux protéines cibles (ou plus) peuvent interagir dans un organisme eucaryote, et donc dans des conditions intracellulaires relativement proches de celles dans lesquelles le virus se trouve intra-hôte ou intra-vecteur dans notre cas. Pour cela, dans le système Y2H classique, un gène d'intérêt codant pour la protéine étudiée est appelé appât (**Fields et Song 1989**). Ce gène est cloné en phase avec la séquence protéique codant pour un domaine de liaison à l'ADN situé dans une région qui

contrôle la transcription d'un gène rapporteur. Ensuite, un ou plusieurs gènes (les proies) interagissant potentiellement avec la protéine appât sont clonés en phase avec le domaine activateur de la transcription. Les levures sont alors transformées avec les deux constructions. Lorsqu'il est seul, chacun des construits (appât ou proie) ne peut pas activer la transcription des gènes essentiels à la pousse des levures. Seule une interaction entre la protéine appât et la protéine proie permet de reconstituer un système complet (reconnaissance de la séquence promotrice et activation de la transcription), qui pourra migrer dans le noyau pour activer l'expression de gènes essentiels à la pousse de la levure. L'interaction entre les deux protéines est de ce fait visualisable par la pousse d'une colonie (**Fields et Song 1989**).

Le but de nos travaux étant de rechercher des interactions entre l'une de nos protéines virales et un possible récepteur au niveau des cellules intestinales du puceron, les systèmes double hybride (Y2H) classiques semblaient peu adaptés. En effet, les proies que nous recherchons sont entre autre des récepteurs avec un ancrage membranaire, et les systèmes Y2H classiques impliquent la migration du couple appât-proie dans le noyau des levures pour activer la transcription. Dans le cas d'une protéine membranaire, le couple appât-proie resterait fixé à la membrane sans jamais pouvoir activer la transcription malgré une interaction réelle. Nous avons donc choisi d'utiliser une variante des systèmes Y2H spécialement conçue pour déceler les interactions avec des protéines membranaires: le système double hybride split-ubiquitine (**Johnsson et Varshavsky 1994**) du kit DUALhunter (Figure 1). Dans cette variante, la protéine appât est clonée dans le plasmide pDHB1 qui permet l'expression de la protéine d'intérêt avec i) un domaine d'ancrage aux membranes (Ost4) fusionné en N-ter et ii) le domaine de liaison à l'ADN (LexA) associé au domaine d'activation (VP16), donc le facteur de transcription complet, fusionné en C-ter. Une spécificité importante est que la protéine appât et le facteur de transcription LexA-VP16 sont reliés par une courte séquence correspondant à un domaine C-ter de l'ubiquitine (Cub). Cette construction exprime donc la protéine appât ancrée à la membrane et fusionnée à une séquence partielle de l'ubiquitine elle-même fusionnée au facteur de transcription. Le facteur de transcription est potentiellement fonctionnel mais son action est bloquée puisqu'il est retenu à la membrane et qu'il ne peut donc pas migrer vers le noyau. La protéine proie, quant à elle, est clonée dans un second plasmide (pPR3-N) et fusionnée au domaine N-ter de l'ubiquitine (Nub). Lors de la transformation de levure avec les deux plasmides, et si les protéines appât et proie interagissent, les parties N- et C-terminales de l'ubiquitine sont assemblées. Le recrutement d'une protéase spécifique (UPB) clive alors l'ubiquitine et libère le facteur de transcription LexA-VP16 qui se retrouve libre de migrer dans le noyau où il

active les gènes rapporteurs (expression des gènes *ade2* et *his3* permettant aux levures d'acquérir l'auxotrophie pour les acides aminés adénine et histidine).

Dans notre cas, la protéine appât est la CP ou NSP du FBNSV, et la protéine proie correspond à un gène venant de la banque d'ADNc construite à partir d'intestin d'*A.craccivora*. Les levures sontensemencées sur différents milieux sélectifs carencés en 4 acides aminés : tryptophane (les levures NMY51 sont auxotrophe pour cet acide aminé), leucine (auxotrophie portée par le plasmide pDHB1 comportant l'appât), l'adénine et l'histidine. Ce système split ubiquitine, couplé au milieu carencé en acides aminés, permet une détection spécifique des interactions entre les protéines appât et proies. L'interaction entre la protéine appât et une protéine proie membranaire (ou pas) est alors visualisable par simple croissance des colonies de levures (**Figure 1, A et B**).

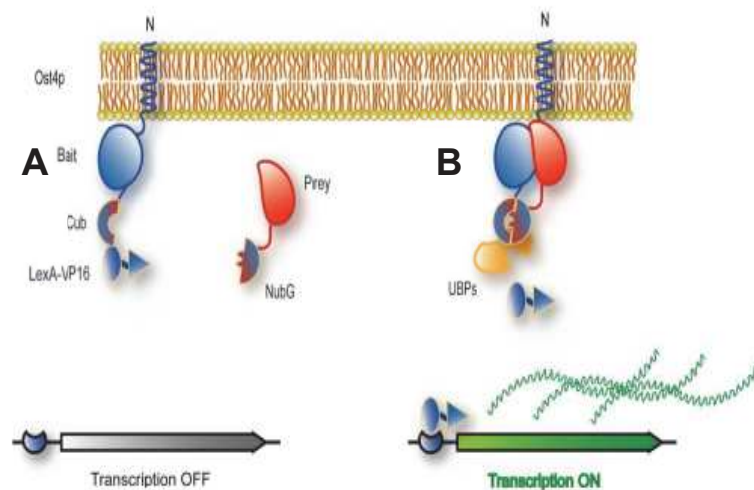


Figure 1. Principe du système double hybride DUALHunter.

Le système DUALHunter comprend une protéine « appât » (bait) fusionnée à la partie C terminale de l'ubiquitine (Cub) elle même fusionnée au facteur de transcription LexA-VP16, le tout ancré à la membrane. La protéine « proie » est fusionnée à la partie N-terminale de l'ubiquitine (NubG). Lorsqu'il n'y a aucune interaction, le facteur de transcription (LexA-VP16) est retenu au niveau de la membrane, il ne peut pas transiter dans le noyau et les levures ne peuvent pas pousser (A). Lorsqu'il y a une interaction, une protéase (UBPs) reconnaissant l'ubiquitine reconstituée est recrutée et, par clivage portéolytique, va libérer LexA-VP16 qui transite alors dans le noyau pour activer la transcription et permettre la pousse des levures (B).

b. Résultats

Le criblage avec la NSP comme appât a entraîné la pousse de 81 colonies de levure, et celui avec la CP a entraîné la pousse de 22 colonies. Sachant qu'une levure peut être transformée simultanément par plusieurs plasmides « proie », des PCRs sont réalisées pour déterminer le nombre de plasmides présents dans chaque colonie récupérée. Ces PCRs ont montré que 34 des 81 colonies de levures issues du criblage NSP ne possédaient aucun

plasmide proie (pas d'amplification du plasmide). Les 57 autres colonies possédaient 1 ou plusieurs plasmides (plusieurs bandes amplifiées de tailles distinctes). Toutes les colonies du criblage CP possédaient un ou plusieurs plasmides proie. Lorsque plusieurs plasmides proies ont été co-transformés, ils sont extraits, séparés par transformation de bactérie et retransformés en levure afin de pouvoir être testés dans la même condition mais individuellement.

Les contrôles d'interaction ont réduit drastiquement le nombre de colonies candidates, que ce soit pour l'interaction avec CP ou NSP (voir détail dans la section suivante). Chaque plasmide indiquant une interaction confirmée lors de ces contrôles a alors été séquencé pour identifier le gène de puceron correspondant. La liste définitive des gènes candidats se trouve dans les **Tables 3 et 4**.

c. Etude biblio et choix des candidats potentiels interactants de CP et NSP.

Malheureusement, dans le cadre de cette thèse, la validation de l'ensemble des candidats identifiés était inenvisageable. Nous avons donc dû choisir et ne travailler en priorité que sur deux protéines: une interagissant potentiellement avec la protéine NSP et la seconde avec la protéine CP. Pour faire ce choix, nous avons tout d'abord décidé de faire un « pari éduqué » sur le potentiel récepteur du FBNSV. Une étude bibliographique a permis de mettre en évidence que, parmi l'ensemble des candidats, la « secretory carrier-associated membrane protein » ou SCAMP (interactant NSP) et la « reticulon » (interactant CP) avaient les propriétés qui répondaient le mieux à nos critères : une possible localisation à la surface des cellules ainsi qu'une implication dans le transport subcellulaire. Avec tous les risques que comporte une telle démarche « a priori », ces deux protéines ont donc été choisies pour tenter de valider l'interaction à l'aide d'autres approches qui sont décrites dans les sections suivantes.

2. Article : Y2H search for proteins of aphid midgut as candidate receptors for the transmission of faba bean necrotic stunt virus

(Manuscrit en préparation)

a. Introduction

Faba bean necrotic stunt virus (FBNSV) is a member species of the family *Nanoviridae* discovered in 1997 in faba bean collected in Ethiopia (Franz *et al.* 1997). FBNSV is a multipartite virus with eight circular ssDNA segments individually encapsidated in distinct particles (Sicard *et al.* 2016). Each segment encodes a unique protein. Segments U1, U2, and U4 encode proteins with unknown functions (Vetten 2011). Segment C encodes the cell cycle-linked protein (Clink)(Aronson *et al.* 2000), segment M the movement protein (MP) (Wanitchakorn *et al.* 2000), segment N the nuclear shuttle protein (NSP)(Franz *et al.* 1999, Grigoras *et al.* 2018), segment S the coat protein (CP)(Chu *et al.* 1993; Katul *et al.* 1997; Wanitchakorn *et al.* 1997) and segment R the master replication-associated protein (M-Rep)(Timchenko *et al.* 1999, 2000; Horser *et al.* 2001). The three aphids species, *Acyrtosiphon pisum*, *Aphis craccivora* and *Myzus persicae* transmit FBNSV (Sicard *et al.* 2015) in a circulative nonpropagative manner (Blanc, Drucker *et Uzest* 2014).

The successful construction of an infectious clone (Grigoras *et al.* 2009) allowed to determine the impact of the omission of any of the eight segments at inoculation on the development of the FBNSV systemic infection in host plants, and on its ulterior transmission by insect vectors (Grigoras *et al.* 2018). These authors found that segments M, R or S are essential for the development of the infection in plants, as the absence of either of them resulted in the absence of detection of viral DNA in the agroinoculated faba beans. Omission of U1 or U2 resulted in infected plants with more or less attenuated symptoms, decreased accumulation and transmission efficiency. Surprisingly, the absence of U4 had no noticeable effect on both plant infection and aphid transmission. Finally, the absence of N did not affect plant infection but totally abolished aphid-transmission. Recently, (Di Mattia *et al.* 2020) observed that no viral DNA could be found within the vector cells when the NSP protein was not produced (i.e. when the segment N was absent or when its initiator ATG codon was mutated). These studies confirm those by (Franz *et al.* 1999) first claiming that a helper component was involved for the transmission of the species *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV), a nanovirus taxonomically very close to FBNSV.

In the *Nanoviridae* family, both the *Banana bunchy to virus* (BBTV) belonging to the genus *Babuvirus* and the FBNSV (genus *Nanovirus*) have been shown to accumulate in the anterior midgut (AMG) and the principal salivary glands (PSG) cells of their respective aphid

vectors (**Bressan and Watanabe 2011, Watanabe and Bressan 2013, Watanabe et al. 2013, Di Mattia et al. 2020**). This localization suggests that putative receptors of nanoviruses may exist at the cell surface of these specific organs. Few viral receptors located at the gut lumen level have been identified for circulative nonpropagative viruses. Until now, only two candidate receptors have been convincingly reported, and both are putative receptors of luteoviruses: the amino peptidase N (**Linz et al. 2015, Tang et al. 2015**) and the ephrin receptor protein (**Mulot et al. 2018**).

We focused our search on aphid proteins interacting either with NSP or with CP of FBNSV. NSP corresponds to the helper component (HC) of nanoviruses, which is supposed to establish a molecular bridge between the virus particle and the receptor at the gut level (**Pirone and Blanc 1996, Froissart et al. 2002, Grigoras et al 2018**). Furthermore, in situ hybridization studies proved that NSP localized inside the cells of the AMG and PSG of the vector *A. pisum* (**Di Mattia et al. 2020**), closely associated with the viral DNA, and this could also allow interactions with other aphid cell proteins once NSP has been internalized. The CP protects the viral DNA and thus is naturally in contact with the environment. The localization of FBNSV CP in the AMG and PSG cells (**Di Mattia et al. 2020**) is also compatible with the idea that CP could interact not only with a membrane receptor but also with intracellular proteins of the vector. To identify the aphid AMG cellular partners of NSP and CP, we used the split-ubiquitin variant of the yeast two-hybrid (Y2H) system which allows the detection of protein-protein interactions even if one or both protein partners are associated to membranes (**Fields et Song 1989**). We here present and discuss the list of potential candidates partners of the FBNSV NSP and CP we could identify.

b. Materials and Methods

1. cDNA library preparation

The cDNA library was prepared from 2 000 guts of *A. craccivora* (apterous adult females) dissected in RNA Later solution (Thermo Fisher®) to prevent RNA degradation. The collected guts were placed in 1.5 mL Eppendorf tubes also containing RNA Later (100 µL) and homogenized with a Teflon mortar. The homogenate was clarified by centrifugation 5 min at 9 300 g and the RNA contained in the supernatant was extracted with the Monarch® total RNA miniprep kit (New England BioLabs). The integrity of the 28S/18S bands were controlled on a 1% agarose gel and the amount of RNA (4.8 µg in total) quantified with a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific). The extracted RNA was sent to Vertis Biotechnologie (Germany) for cDNA library preparation as describe in Ryckebush PhD thesis, 2020.

Table 1. Primers used in this study.

Primers	Forward	Reverse
pDHB1	5' TTTCTGCACAATATTTCAAGC 3'	5' GTAAGGTGGACTCCTTCT 3'
pPR3-N	5' GTCGAAAATTCAGACAAGG 3'	5' AAGCGTGACATAACTAATTAC 3'

2. Bait constructions, yeast transformation and expression test

For bait constructions, the coding sequences of the NSP and CP were first PCR-amplified with Pfu (Promega®) using specific primers bearing distinct *Sfi* I restriction sites that recognized sequence GGCCNNNN'NGGCC (N represent variable nucleotide and the " ' " indicates the cleavage site). In the DUALhunter vectors, the *Sfi* I restriction sites recognize the sequences GGCCATTA'CGGCC and GGCCGCCT'CGGCC. The amplicons were cloned in the plasmid pGemT and the resulting plasmids were used to transform the strain DH5α of *Escherichia coli* for multiplication. Amplicons were removed from pGem T by digestion with *Sfi* I and ligated (using T4 DNA ligase) in the plasmid pDHB1 cut with the same enzyme to create the pDHB1-NSP and the pDHB1-CP constructs. Sequence conformity was verified by Sanger sequencing with the pDHB1 primers (**Table 1**).

Then, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain NMY51 (Standard reporter strain carrying the *HIS3* and *ADE2* reporter gene, which are two auxotrophic growth markers) was transformed with pDHB1-NSP or -CP following the protocol of the DUALhunter kit (Dualsystems Biotech®). Briefly, for an optimal transformation, 100 μL of yeast grown at 30°C to an OD₅₄₆ of 0.6-0.8 was incubated 45 min at 42°C with 1.5 μg of the transforming plasmid in presence of a PEG/LiOAc mix (50 % PEG, 1 M LiOAc and 125 μL of single-stranded carrier DNA – Dualsystems Biotech®). After a 5 min centrifugation at 700 rpm, 0.9 % NaCl was added to the transformed yeasts, which were plated onto SD-Leu or SD-Trp plates (**Table 2**).

Table 2. Components (amino acids and nucleobase) of drop-out plates.

Plate drop-out	Missing components
SD-Leu	Leucine (amino acid)
SD-Trp	Tryptophan (amino acid)
SD-Trp-Leu	Tryptophan and leucine (amino acids)
SD-Trp-Leu-His	Tryptophan, leucine and histidine (amino acids)
SD-Trp-Leu-His-Ade	Tryptophan, leucine and histidine (amino acids), Adenine (nucleobase)

The correct expression of each bait (either NSP or CP) fusion protein in yeast was controlled by Western-blot after total extraction of the proteins from cells incubated at 30°C until an OD₅₄₆ of 0.6-1. The Western-blot was performed as described previously in (**Di Mattia et al. 2020**). Briefly, as a primary antibody, we used either the rabbit anti-Lexa antibody. The secondary antibody was an anti-rabbit IgG coupled with horseradish peroxidase (HRP – produced in goat; sigma). Controls of expression (empty pDHB1, pDHB1-Large T and pPR3-N) were run in parallel to pDHB1-NSP or -CP. Finally, double transformations were done to control the presence of colonies in the case of a positive interaction and the absence of them in the absence of interaction. For this purpose, NMY51 was co-transformed with our bait plasmids or pDHB1-Large T (positive control) and either the plasmids pAI-Alg5 (positive growth control) or pDL2-Alg5 (negative control). Another positive control was performed using the plasmids pDHB1-Large T and pDSL-Dp53 whose proteins are known to interact. These controls are simply recommended and detailed in the manufacturer instructions.

3. Optimization of the screening stringency

Optimization of the screening stringency was done by depositing NMY51 transformed with our baits onto SD-Trp-Leu-His plates (**Table 2**) complemented with increasing concentrations (0 to 50 mM) of 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT). 3-AT is a competitive inhibitor of the HIS3 gene product, which reduces false positive Growth of the yeast.

4. Search of vector proteins interacting with NSP or CP

Plasmids derived from the *A. craccivora* cDNA library (preys) and pDHB1-NSP or -CP (baits) were co-transformed into the NMY51 cells, cultured at 30 °C for 3 days. The cultures were then plated on a series of selective agar plates, including SD-Trp-Leu and 12.5 (NSP condition) and 15 mM (CP condition) 3-AT SD-Trp-Leu-Ade-His selective media and incubated for 3 days at 30 °C. The positive colonies (those that actually grew in these plates) were inoculated into SD-Trp-Leu liquid medium for 14 h at 30 °C. The plasmids were then extracted (**Nicolas 1999**) and re-transformed into *E. coli* DH5α. After PCR amplification of plasmid inserts with primers pPR3-N (**Table 1**), amplicons were subjected to Sanger sequencing using the same primers. The sequences were analyzed using the BLAST, Basic Local Alignment Search Tool (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch), of the GenBank database to obtain the gene name of potential candidates (preys) that interacted with the baits.

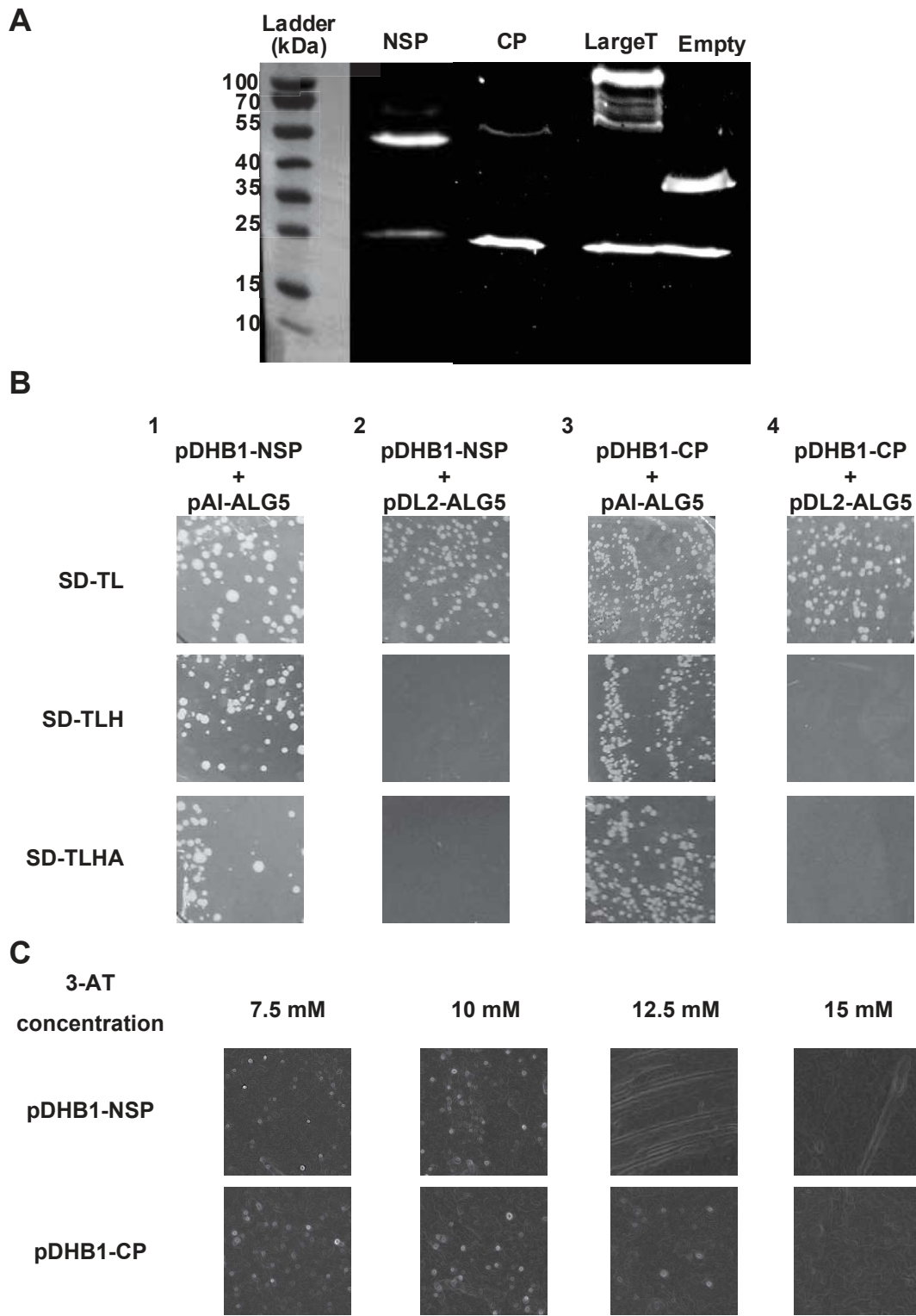


Figure 1. Expression of NSP* and CP-fusion proteins.

A. Western-blot of NSP and CP expressed in yeast strain NMY51. B. Co-transformation of yeast with pAI-ALG5 and either pDHB1-NSP (1) or pDHB1-CP (3) give recombinant colonies on restrictive medium. Co-transformation of yeast with pDL2-ALG5 and either pDHB1-NSP (2) or pDHB1-CP (4) do not give recombinant colonies in restrictive medium. All tests were carried out using SD-TL (as a positive control of growth), SD-TLH and SD-TLHA represent the media in which yeast can grow solely if the bait and prey proteins do interact. C. Effect of different concentrations of 3-AT on autoactivation produced by pDHB1- NSP or pDHB1-CP.

5. Validation of the bait-prey interaction and control of prey auto-activation

The controls of the bait-prey interactions were performed by co-transforming pPR3N-X (prey) and pDHB1-NSP or pDHB1-CP (baits) into the NMY51 strain. The co-transformants were grown on SD-Trp-Leu (SD-TL), SD-Trp-Leu-His (SD-TLH), and SD-Trp-Leu-His-Ade (SD-TLHA) agar plates for 3 days at 30 °C. Interactions were considered positive when colonies developed and false positive otherwise. Then, possible auto-activation of potential prey candidates was tested. For that, each pPRN3-prey plasmid was individually co-transformed with the pDHB1-Large T plasmid where no interaction should be observed. All the prey candidates giving yeast colonies were considered as auto-activators of the system and were eliminated. The other prey-candidates were considered *bona fide* interactants.

c. Results

1. Validation of the bait constructions and optimization of the screening

Sequencing confirmed the correct insertion of the NSP and CP baits in the plasmid pDHB1. Then, verification of the expression of the fusion proteins in yeast was performed by Western blot analyses as shown in **figure 1A**. The presence of proteins with a molecular weight of 58.3 kDa and 62.6 kDa corresponded respectively to NSP and CP fused to the activator (activator: 43 kDa; NSP: 15.3 kDa; CP: 19.6 kDa). Finally, co-transformation of our bait constructs with pAI-Alg5 (positive control) and pDL2-Alg5 (negative control) gave colonies in the case of the positive control and no colonies for the negative control. These three verifications demonstrated the correct expression of the NSP- and CP-fusion proteins in yeast and the validation of the interaction system (**Figure 1B**).

The library screening was optimized by addition of 3-AT to the medium at concentrations inhibiting auto-activation and growth of yeast that would solely be due to bait expression. A final concentration of

12.5 mM for NSP and 15 mM for CP represented the minimum 3-AT concentrations giving no colonies (Figure 2C) and were used in all our further experiments.

2. Yeast two-hybrid screen of *A. craccivora* cDNA library using the baits pDHB1-NSP and pDHB1-CP

Co-transformation of the cDNA library containing the *A. craccivora* AMG sequences was done using either pDHB1-NSP or pDHB1-CP. As yeast can be transformed by several plasmids at the same time, in each “positive” colony it was necessary to verify whether one or more plasmid-preys were present, and to eventually separate them before going further.

Table 3. Validated Y2H NSP-interacting candidates

Identified candidates	Functions	Reference for functions	Cellular localization	Reference for localization
Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic-like	Cholesterol homeostasis	(<i>Chang et al. 2009</i>)	- Cytosol	<i>Uniprot source</i>
Choline transporter (CTL)-like protein 2	- Precursor of the synthesis of the acetylcholine. - Used in cells as osmolytes and intracellular messenger	(<i>Blusztajn 1998; Traiffort et al. 2005</i>)	- Plasma membrane - Mitochondrial membrane	(<i>Traiffort et al. 2005</i>)
Phospholipid-transporting ATPase IIB	Regulation of: - Cell volume - Intracellular pH - Acid secretion - Signaling pathway	<i>Paulusma et Oude Elferink 2005</i>)	- Plasma membrane - Organelles membrane	(<i>Pedersen et Carafoli 1987; Møller, Juul, et le Maire 1996</i>)
Secretary carrier-associated membrane protein 1	- Endocytosis pathway - Cell surface recycling pathway - Degradation pathway - Exocytosis pathway	(<i>Hubbard et al. 2000</i>)	Endosomal vesicle	<i>Law, Chow, et Jiang 2012</i>
Transmembrane protein 256	No know function	<i>Uniprot source</i>	NA	NA

Table 4 Validated Y2H CP-interacting candidates

Identified candidates	Functions	Reference for functions	Cellular localization	Reference for localization
ER membrane protein complex subunit 6	Autophagy regulator/activator	(<i>Li et al. 2013</i>)	Endoplasmic reticulum	(<i>Li et al. 2013</i>)
ER membrane protein complex subunit 10	Maintain of human male fertility	(<i>Zhou et al. 2018</i>)	Endoplasmic reticulum	(<i>Zhou et al. 2018</i>)
Proton-coupled amino acid transporter-like protein (CG1139)	- pH-dependent Electrogene charge and amino acids transport - Autophagy activator	<i>Goberdhan et al. 2005</i>)	- Plasma membrane - Late endosome - Lysosome	(<i>Ögmundsdóttir et al. 2012</i>)
Reticulon	- Formation recycling vesicle (Golgi/ER trafficking) - ER morphogenesis - Apoptosis - Mitochondrial function	(<i>Yang et Strittmatter 2007; Di Sano et Piacentini 2012</i>)	- Endoplasmic reticulum - Plasma membrane	(<i>Wakana et al. 2005; Mukherjee et Levy 2019</i>)
Transmembrane protein 165	- Proton and calcium transporter - Lysosome pH homeostasis	(<i>Demaegd et al. 2013</i>)	- Plasma membrane - Golgi - Late endosome - Lysosome	(<i>Potelle et al. 2017</i>)
Zinc transporter 11	Cellular homeostasis	(<i>Bafaro et al. 2017</i>)	Organelles membranes	(<i>Bafaro et al. 2017</i>)

For this, plasmids present in each yeast colony were extracted and individualized via transformation into *E. coli* (which generally harbor only one plasmid). All plasmids recovered from *E. coli* colonies were individually sequenced. 54 plasmids originating from the different yeast colonies were obtained for NSP and 32 for CP (Supplementary Figure S1). Sequence analysis of plasmids isolated from bacteria identified 43 and 26 different *A. craccivora* cDNAs recovered for NSP and CP, respectively (**Supplementary material S1 and S2**). To eliminate the uncertainties resulting from co-transformed prey-plasmids in yeast, two supplementary controls were performed. First, each prey-plasmid individualized in *E. coli* was re-transformed in a yeast colony containing its specific viral bait plasmid. This allowed to verify that the positive interaction was retained when only the tested plasmid was present. Second, the plasmid validated after this first step were transformed in a yeast colony containing the plasmid pDHB1-Large T to eliminate all auto-activating candidates. As a result, 5 and 6 aphid candidate genes were finally validated to respectively interact with NSP (**Table 3**) and CP (**Table 4**) in this split ubiquitin Y2H system.

3. Function and intracellular localization of the Y2H-validated interacting candidates of NSP and CP.

Information available for most aphid proteins is generally scarce and it is the reason why, in these cases, we used human (or other vertebrates) orthologues to hint on the putative function and localization of the identified candidates in the insect vector (**Table 3 and 4**). On the basis of their hypothesized characteristics, we selected two candidates (one among NSP and another among CP putative partners) for further validation attempts.

NSP-candidate selected for further validation: the Secretory carrier-associated membrane protein (SCAMP)

The SCAMP protein family is a highly conserved protein family in all organisms (**Hubbard et al. 2000**). They exhibit many conserved motifs between different species and notably 4 transmembrane domains. Gene ontology data shows that proteins of the SCAMP family may function in all steps of the endocytic pathway in humans and vertebrates. Moreover, they are found, though not exclusively, at the plasma membrane. For these reasons, we retained the *A. craccivora* SCAMP orthologue as a putative receptor candidate for NSP and thus for FBNSV transmission.

Five SCAMP proteins are described in humans (**Hubbard et al. 2000; Han et al. 2009**). They are all implicated in intracellular transport as they allow the entry, the circulation and the exit from the cells (**Law, Chow, et Jiang 2012a**). In the only whole-sequenced aphid genome (*A. pisum*), only one gene is found which encodes for two isoforms of SCAMP

(AphidBase 2021). However, the sequence cloned in the cDNA library is located in a common region and thus it is probable that NSP can interact with both isoforms, which could have distinct functions and localizations.

CP-candidate selected for further validation: the reticulon

Among the five putative candidates interacting with CP, one, the reticulon, is studied in more details. In vertebrates or humans, reticulon appears localized at the plasma membrane and has a role in the exocytic pathway. This protein is involved in intracellular trafficking (**Yang et Strittmatter 2007**), and could hypothetically be used by FBNSV particles to cross the AMG cell membrane and pass into the hemolymph. Various viruses that infect plant (*Brome mosaic virus*) or vertebrate (Poxviruses) were described to interact with the reticulon (**Diaz, Wang, et Ahlquist 2010; Erlandson et al. 2016**). In the aphid genome (*A. pisum*), only one gene encode for three isoforms (AphidBase 2021). The alignment of the sequence obtained for the Y2H-positive clone allowed to determine that the N-terminal cytosolic part of the isoform 1 interacted with the CP

d. Conclusion

Deciphering the interactions between plant viruses and their insect vectors is of major importance to unveil the molecular mechanisms underlying virus transmission. Fine understanding of these mechanisms could allow the development of strategies to control virus infection of plants, for example by controlling aphid acquisition and/or inoculation. Many studies report on the subcellular pathway followed by plant viruses in the circulative non-propagative mode of transmission to cross the gut barrier (**Gray et Gildow 2003; Brault et al. 2007; Xia et al. 2018**). Data available for luteoviruses and geminiviruses indicate that species in these two unrelated families at least partially follow a similar subcellular pathway. Viruses from these two clades were observed in clathrin-coated vesicles and later in early endosomes (**Brault et al. 2007, Xia et al. 2018**). From there, they are transported to the basal part of the plasma membrane by an unknown process, though tubular vesicles may be involved for luteoviruses that have not been observed for geminiviruses. One obvious difference between these two groups is the lysosome localization of luteoviruses which has not been reported for geminiviruses (**Brault et al. 2007**). Until now, only one publication addressed the mode of entry of a nanovirus (BBTV) into its vector midgut cells. Unfortunately, likely due to poorly adapted markers of subcellular compartments (most of these markers were developed in vertebrate cells or at best in dorsophila, but never in aphids), no clear conclusions could be drawn (**Watanabe et al. 2016**). As mentioned in the introduction section, two candidate receptors were identified and validated in the transmission of

luteoviruses: the aminopeptidase N (**Linz et al. 2015, Tang et al. 2015**) and the ephrin receptor protein (**Mulot et al. 2018**). Nevertheless, the subcellular process of the transcytosis of these viruses remains poorly understood. The identification of a receptor for FBNSV would represent a first step for deciphering the molecular nanovirus-vector interaction and to evaluate whether it could be similar to that foreshadowed in the two other non circulative virus families. Here, we identified and make public several candidates which could pave the way for future studies dealing with the pathways mobilized by FBNSV particles to enter into the aphid cell and interact with components of AMG.

According to the related literature, the candidates found in this study have different possible intracellular localizations. Several could be located, though possibly not exclusively, at the level of the plasma membrane (SCAMP, the proton-coupled amino acid transporter-like protein, reticulon, the transmembrane protein 165). Others are probably associated to subcellular structures as the ER (ER membrane protein complex subunits 6 and 10 or reticulon), the Golgi (Transmembrane protein 165), or/and could have an endosomal localization (SCAMP protein, transmembrane protein 165 or Proton-coupled amino acid transporter-like protein). Finally, interactions with cytoplasmic proteins, presumably unbound to membrane, (Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic-like) were also detected (For references see Tables 3 and 4). This list points at cellular structures where one could specifically look for the viral proteins in vector gut cells. Unfortunately, high quality markers such as antibodies which would be specific for aphid subcell compartments are lacking and constitute a technical bottleneck that our community needs to rapidly release.

While we provide information about aphid proteins possibly involved in entry and transit of nanoviruses across midgut cells, no definitive conclusion can be drawn. First, we are not sure that all possible genes corresponding to all FBNSV-interacting aphid proteins were represented in the cDNA library. In fact, the possibility of overlooking potential candidates exists at each step, from the gut RNA extraction to the final screening of the library (**Van Criekinge et Beyaert 1999**). Moreover, the necessary 3-AT stringency may eliminate low interaction partners (**Chen et al. 2010**), and it is thus important for future studies to also consider the additional protein candidates listed in the supplementary table S1 and S2. Second, it will be mandatory to confirm the interaction detected in the Y2H system using another technique (**Brückner et al. 2009**). Several protocols can be envisaged for *in vitro* (**Miura 2018**) validation, such as pull-down assays, co-immunoprecipitation, or co-localization, but here again, the lack of specific antibodies for aphid proteins is a problem. The ultimate validation is the *in vivo* functional validation (**Xing et al. 2016**) and this would involve the set up silencing (**Pitino et al. 2011; Webster et al. 2018; Ye et al. 2019**) or

mutation (CRISPR; **Cong et Zhang 2015; Le Trionnaire et al. 2019**) of aphid genes and transmission testing.

SCAMP, by its location at the plasma membrane and its potential role in all steps of the endosomal pathway (**Law et al. 2012a**), could participate in FBNSV internalization within cells and crossing of the AMG barrier. Reticulon, also located at the plasma membrane (**Wakana et al. 2005**), could as well be involved in the uptake of the virus by the cells. Indeed, this protein allows intracellular transport of viruses and promotes exocytosis in mammalian cells (**Mukherjee et Levy 2019**). It could fulfill these functions in the case of FBNSV.

To complete this search for candidate aphid proteins potentially interacting with FBNSV and intervening in the transmission success, an additional consideration appears important. We here logically focused on the viral protein NSP and CP, but we cannot exclude that other viral protein may penetrate in aphids and be important for transmission. Agro-inoculation of incomplete sets of viral segments to plants showed that vector transmission of nanoviruses is possible, more or less efficiently, in absence of Clink, U1, U2 and U4 proteins (**Grigoras et al. 2018**). However, we still do not know whether proteins mandatory for plant infection, i. e. MP and Rep, are also required for transmission by vectors. The development of an *in vitro* acquisition system with only purified NSP and FBNSV viral particles could answer this question. Future screening of proteins MP and M-Rep, in particular using the Y2H system, could also provide interesting information on unforeseen interaction between nanoviruses and aphids.

e. References

- Anon. s. d. « AphidBase: a centralized bioinformatic resource for annotation of the pea aphid genome - Legeai - 2010 - Insect Molecular Biology - Wiley Online Library ». Consulté 17 février 2021 (<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2583.2009.00930.x>).
- Brault, V., E. Herrbach, et C. Reinbold. 2007. « Electron Microscopy Studies on Luteovirid Transmission by Aphids ». *Micron* 38(3):302-12.
- Brückner, A., C. Polge, N. Lentze, D. Auerbach, et U. Schlattner. 2009. « Yeast Two-Hybrid, a Powerful Tool for Systems Biology. » *International Journal of Molecular Sciences* 10(6):2763-88. doi: 10.3390/ijms10062763.
- Chen, Y. C., S. V. Rajagopala, T. Stellberger, et P. Uetz. 2010. « Exhaustive Benchmarking of the Yeast Two-Hybrid System ». *Nature Methods* 7(9):667-68; author reply 668. doi: 10.1038/nmeth0910-667.
- Chu, P. W. G., K. Paul, Q. B. Sheng, P. M. Waterhouse, et W. L. Gerlach. 1993. « Putative Full-Length Clones of the Genomic DNA Segments of Subterranean Clover Stunt Virus and Identification of the Segment Coding for the Viral Coat Protein ». *Virus Research* 27(2):161-71. doi: 10.1016/0168-1702(93)90079-3.

- Cong, Le, et F. Zhang. 2015. « Genome Engineering Using CRISPR-Cas9 System ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1239:197–217. doi: 10.1007/978-1-4939-1862-1_10.
- Diaz, A., X. Wang, et P. Ahlquist. 2010. « Membrane-Shaping Host Reticulon Proteins Play Crucial Roles in Viral RNA Replication Compartment Formation and Function ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(37):16291–96. doi: 10.1073/pnas.1011105107.
- Erlanson, K. J., H. Bisht, A. S. Weisberg, S. I. Hyun, B. T. Hansen, E. R. Fischer, J. E. Hinshaw, et B. Moss. 2016. « Poxviruses Encode a Reticulon-Like Protein that Promotes Membrane Curvature ». *Cell reports* 14(9):2084–91. doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.075.
- Fields, Stanley, et Ok-kyu Song. 1989. « A Novel Genetic System to Detect Protein–Protein Interactions ». *Nature* 340(6230):245–46. doi: 10.1038/340245a0.
- Gray, S., et F. E. Gildow. 2003. « Luteovirus-aphid interactions ». *Annu Rev Phytopathol* 41:539–66.
- Grigoras, I., H. J. Vetten, U. Commandeur, H. Ziebell, B. Gronenborn, et T. Timchenko. 2018. « Nanovirus DNA-N Encodes a Protein Mandatory for Aphid Transmission ». *Virology* 522:281–91. doi: 10.1016/j.virol.2018.07.001.
- Han, C., T. Chen, M. Yang, N. Li, H. Liu, et X. Cao. 2009. « Human SCAMP5, a Novel Secretory Carrier Membrane Protein, Facilitates Calcium-Triggered Cytokine Secretion by Interaction with SNARE Machinery ». *The Journal of Immunology* 182(5):2986–96. doi: 10.4049/jimmunol.0802002.
- Horser, C. L., R. M. Harding, et J. L. Dale. 2001. « Banana Bunchy Top Nanovirus DNA-1 Encodes the “master” Replication Initiation Protein ». *The Journal of General Virology* 82(Pt 2):459–64. doi: 10.1099/0022-1317-82-2-459.
- Hubbard, C., D. Singleton, M. Rauch, S. Jayasinghe, D. Cafiso, et D. Castle. 2000. « The Secretory Carrier Membrane Protein Family: Structure and Membrane Topology ». *Molecular Biology of the Cell* 11(9):2933–47.
- Katul, L., E. Maiss, S. Y. Morozov, et H. J. Vetten. 1997. « Analysis of Six DNA Components of the Faba Bean Necrotic Yellows Virus Genome and Their Structural Affinity to Related Plant Virus Genomes ». *Virology* 233(2):247–59. doi: 10.1006/viro.1997.8611.
- Law, A. H. Y., C. M. Chow, et L. Jiang. 2012. « Secretory Carrier Membrane Proteins ». *Protoplasma* 249(2):269–83. doi: 10.1007/s00709-011-0295-0.
- Le Trionnaire, G., S. Tanguy, S. Hudaverdian, F. Gleonnec, G. Richard, B. Cayrol, B. Monsion, E. Pichon, M. Deshoux, C. Webster, M. Uzest, A. Herpin, et D. Tagu. 2019. « An Integrated Protocol for Targeted Mutagenesis with CRISPR-Cas9 System in the Pea Aphid ». *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 110:34–44. doi: 10.1016/j.ibmb.2019.04.016.
- Miura, K. 2018. « An Overview of Current Methods to Confirm Protein-Protein Interactions ». *Protein and Peptide Letters* 25(8):728–33. doi: 10.2174/0929866525666180821122240.
- Mukherjee, R. N., et D. L. Levy. 2019. « Reticulon 4a promotes exocytosis in mammalian cells ». *Molecular Biology of the Cell* 30(18):2349–57. doi: 10.1091/mbc.E19-03-0159.
- Nicolas, G. 1999. « Étude fonctionnelle et structurale de certains domaines des spectrines érythroïdes et non érythroïdes : site de tétramérisation et domaine SH3 ». phdthesis, Université Paris-Diderot - Paris VII.
- Pitino, M., A. D. Coleman, M. E. Maffei, C. J. Ridout, et S. A. Hogenhout. 2011. « Silencing of Aphid Genes by DsRNA Feeding from Plants ». *PLoS One* 6(10):e25709.

- Timchenko, T., L. Katul, Y. Sano, F. de Kouchkovsky, H. J. Vetten, et B. Gronenborn. 2000. « The Master Rep Concept in Nanovirus Replication: Identification of Missing Genome Components and Potential for Natural Genetic Reassortment ». *Virology* 274(1):189–95.
- Timchenko, T., F. de Kouchkovsky, L. Katul, C. David, H. J. Vetten, et B. Gronenborn. 1999. « A Single Rep Protein Initiates Replication of Multiple Genome Components of Faba Bean Necrotic Yellows Virus, a Single-Stranded DNA Virus of Plants ». *J Virol* 73(12):10173–82.
- Van Criekeing, W., et R. Beyaert. 1999. « Yeast Two-Hybrid: State of the Art ». *Biological Procedures Online* 2:1–38. doi: 10.1251/bpo16.
- Wakana, Y., S. Koyama, K. Nakajima, K. Hatsuzawa, M. Nagahama, K. Tani, H. P. Hauri, P. Melançon, et M. Tagaya. 2005. « Reticulon 3 Is Involved in Membrane Trafficking between the Endoplasmic Reticulum and Golgi ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334(4):1198–1205. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.07.012.
- Wanitchakorn, R., R. M. Harding, et J. L. Dale. 1997. « Banana Bunchy Top Virus DNA-3encodes the Viral Coat Protein ». *Archives of Virology* 142(8):1673–80. doi: 10.1007/s007050050188.
- Webster, C. G., E. Pichon, M. van Munster, B. Monsion, M. Deshoux, D. Gargani, F. Calevro, J. Jimenez, A. Moreno, B. Krenz, J. R. Thompson, K. L. Perry, A. Fereres, S. Blanc, et M. Uzest. 2018. « Identification of Plant Virus Receptor Candidates in the Stylets of Their Aphid Vectors ». *Journal of Virology* 92(14). doi: 10.1128/JVI.00432-18.
- Xia, W. Q., Y. Liang, Y. Chi, L. L. Pan, J. Zhao, S. S. Liu, et X. W. Wang. 2018. « Intracellular trafficking of begomoviruses in the midgut cells of their insect vector ». *PLoS Pathogens* 14(1). doi: 10.1371/journal.ppat.1006866.
- Xing, S., N. Wallmeroth, K. W. Berendzen, et C. Grefen. 2016. « Techniques for the Analysis of Protein-Protein Interactions in Vivo1[OPEN] ». *Plant Physiology* 171(2):727–58. doi: 10.1104/pp.16.00470.
- Yang, Y. S., et S. M. Strittmatter. 2007. « The reticulons: a family of proteins with diverse functions ». *Genome Biology* 8(12):234. doi: 10.1186/gb-2007-8-12-234.
- Ye, C., Y. D. Jiang, X. An, L. Yang, F. Shang, J. Niu, et J. J. Wang. 2019. « Effects of RNAi-based silencing of chitin synthase gene on moulting and fecundity in pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) ». *Scientific Reports* 9. doi: 10.1038/s41598-019-39837-4.

f. Supplementary material

Table S1. List of the gene candidates found in yeast colonies for the NSP-bait protein

	Prey-plasmid sequencing results
1	Transmembrane protein 165
2	Mitochondrial sodium/hydrogen exchanger 9B2-like
3	DNA-binding protein pokkuri-like
4	60S ribosomal protein L18a
6	A.a transporteur/perméase
7	GPI ethanolamine phosphate transferase 3
8	Uncharacterized LOC100572795
9	NCK-interacting protein kinase
10	Probable phospholipid-transporting ATPase IIB
11	Uncharacterized LOC111038748 or replication protein A 14 kDa subunit-like
12	Traf2
13	Transmembrane protein 256 homolog
14	Proton-coupled amino acid transporter-like protein pathetic
15	Zinc finger protein 160-like
16	Glutamate-gated chloride channel-like isoform X1
17	Zinc transporter ZIP11
18	Tyrosine kinase receptor Cad96Ca
19	Haloacid Dehalogenase-like Hydrolases
20	Cathepsin B/Peptidase family C1 propeptide
21	Macoilin-1-like (LOC111040621), transcript variant X2, mRNA
22	12S small subunit ribosomal
23	EF-1 guanine nucleotide exchange domain
24	ER membrane protein complex subunit 6
25	Protein transport protein Sec61 subunit beta
26	Cyclases involved in the biosynthesis of
27	Choline transporteur (CTL)-like protein 2 (LOC112597550), transcript variant X7
28	Uncharacterized LOC100169120
29	Cytochrome P450 6CY16 mRNA
30	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3
31	Probable Bax inhibitor 1
32	ATP synthase subunit C
33	Leucine-rich repeat-containing protein 55-like
34	BAG domain-containing protein
35	Tyramine receptor 1
36	Phosphoglycerate dehydrogenase
37	Complete genome
38	Secretory carrier-associated membrane protein 1/ SCAMP family
38	Facilitated trehalose transporter Tret1
39	Calcium uptake protein 3, mitochondrial
40	Enolase isoform 2
41	DnaJ homolog subfamily A member 1
42	ATP synthase subunit d
43	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic-like

Bold characters indicate the validated Y2H NSP-interacting candidates.

Table S2. List of the gene candidates found in yeast colonies for the CP-bait protein

	Prey plasmid sequencing results
1	<i>Acyrtosiphon pisum</i> strain LSR1 carotene dehydrogenase (tor) gene, tor-R allele
2	ER membrane protein complex subunit 10 (LOC107161827)
3	<i>Melanaphis sacchari</i> uncharacterized LOC112598051
4	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondria
5	Proton-coupled amino acid transporter-like protein CG1139
6	B(0,+)-type amino acid transporter 1-like
7	Sugar transporter SWEET1-like
8	Ipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha factor homolog
9	Syndecan (LOC112596355)
10	V-type proton ATPase subunit G
11	Reticulon 1 (Rtnl1), transcript variant X1
12	12S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; tRNA-Val gene, complete sequence; and 16S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial
13	Programmed cell death protein 4
14	Solute carrier family 35 member E2-like
15	Integrin beta-PS
16	Proteasome subunit alpha type-6-like
17	Cytochrome c oxidase subunit I
18	Mitochondrial carrier protein Rim2
19	Zinc transporter 11
20	RNA-binding protein 1-like
21	ER-degradation enhancing alpha-mannnosidase like protein 2 D. 26S protease subunit like protein
22	AATP synthase subunit d, mitochondrial-like (LOC112712571)
23	U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10
24	ER membrane protein complex subunit 6
25	Cathepsin B (catb-mp2)
26	Cytochrome b (cytb)
27	Transmembrane protein 165

Bold characters indicate the validated Y2H CP-interacting candidates.

3. Essais de validation des interactions détectées avec le système Y2H.

a. Introduction

Pour valider les interactions obtenues dans le système Y2H, nous avons décidé d'utiliser, dans un premier temps, la technique de « GST pull-down ». Si l'interaction est réelle, cette technique doit nous permettre de spécifiquement purifier les protéines virales d'intérêt grâce à l'expression de peptides proies couplés à de la GST. En parallèle à cette validation, nous avons également tenté de localiser la protéine SCAMP dans le puceron à l'aide d'un anticorps que nous avons fait produire. Enfin, nous avons essayé de marquer divers organites présents dans la cellule de l'AMG du puceron en utilisant des anticorps commerciaux afin de réaliser ultérieurement des co-localisations avec des constituants viraux. Malheureusement, ces travaux de validation ont pour l'instant échoué. Ils devront être poursuivis, et n'ont pas été intégrés dans l'article rédigé pour ce chapitre 4. Les tentatives présentées ci-dessous seront publiées séparément quand et si elles peuvent être finalisées à l'avenir.

b. Matériels et méthodes : GST pull-down

En vue de confirmer les interactions entre NSP et CP et leurs potentiels partenaires cellulaires détectés par le système Y2H, un GST pull-down a été réalisé en appliquant le protocole du fournisseur du kit MagneGST™ (Promega, Madison, USA). En bref, les séquences codantes correspondant aux peptides proies identifiés par Y2H ont été transférées du plasmide pDHB1 au plasmide pGex-3X par digestion enzymatique *EcoR* I et *Bam* HI puis ligation aux mêmes sites. Les séquences virales clonées dans le plasmide pGex-3X sont alors produites en fusion avec la GST (glutathione S transférase), protéine qui se fixe spécifiquement au glutathione couplé à des billes magnétiques. Les séquences clonées ont été contrôlées par séquençage et les plasmides ont ensuite été transférés dans les souches d'*Escherichia coli* BL21 ou Rosetta II (Novagen®), qui dérive de BL21. La production de GST-PP (nom générique donné aux protéines GST-peptide proie) est induite avec de l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pendant 5 h. La GST a un poids moléculaire de 25 kDA et les peptides candidats ont un poids moléculaire compris entre 11 et 17 kDA selon les prédictions faites avec l'outil « Compute pI/Mw tool » d'EsPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/). La purification des extraits cellulaires et le pull-down GST ont été réalisés en suivant le protocole du kit MagneGST™. Brièvement, les protéines de fusion GST-PP sont d'abord incubées avec des billes magnétiques couplées au glutathion.

A

T-	GST seule non induite	T+	GST seule induite
Possibles interactants de NSP		Possibles interactants de CP	
1	Phospholipid-transporter ATPase IIB	1'	Reticulon
2	Choline transporter	2'	Proton coupled amino acid transporter (CG1139)
3	SCAMP	3'	Zinc transporter ZIP11
4	TMEM 256	4'	ER membrane protein complex subunit 6
5	Acetyl CoA acétyltransferase	5'	ER membrane protein complex subunit 10
		6'	TMEM 165

B

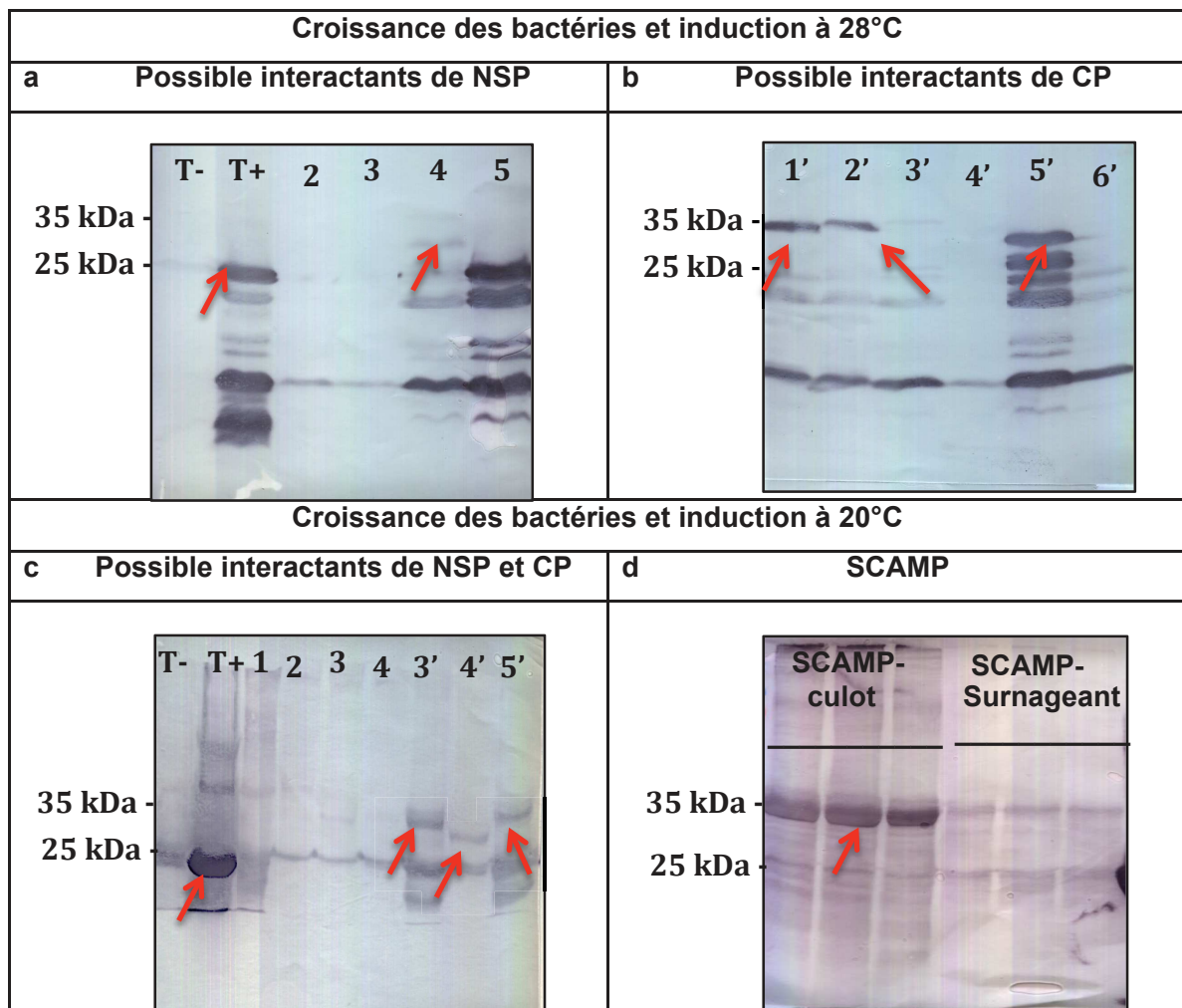


Figure 2. Western Blot des peptides candidats produits dans les bactéries Rosetta II.

Figure A. Liste de tous les candidats obtenus dans le système Y2H avec leur numéro associé. Figure Ba et Bb. Tests d'expression réalisés à 28°C. Figure Bc. Tests d'expression à 20°C réalisés pour les candidats n'ayant pas été exprimés à 28°C. Figure Bd. Expression à 20°C de la protéine SCAMP (trois réplicats) observation de la présence du complexe GST-SCAMP dans le culot et le surnageant (D). Les flèches rouges indiquent les bandes correspondant à la taille attendue pour chaque candidat.

Après trois lavages (tampon d'adsorption et de lavage : 4.2 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 10 mM KCl), seules les GST-PP devraient rester spécifiquement fixées sur les billes. Ensuite, les protéines virales (NSP ou CP) produites soit dans la plante (protéines extraites par broyage de tige de fèves infectées par le FBNSV dans un tampon 20 mM Tris HCl de pH8.0, en présence de 0.2 % Na₂SO₃, Complete® EDTA-Free (cocktail d'inhibiteurs de protéases – Roche®)) soit en cellules d'insectes par un baculovirus recombinant (cellules homogénéisées par congélation/décongélation dans le tampon du pull-down), sont incubées avec les billes magnétiques sur lesquelles sont fixées les GST-PP. Après trois lavages pour éliminer ce qui n'interagit pas avec les GST-PP, les billes magnétiques sont déposées sur un gel SDS-polyacrylamide à 12% (Laemmli, 1970). Après transfert des protéines sur membrane de cellulose, un Western-blot a été réalisé en utilisant les anticorps anti-GST (GST Tag Polyclonal Antibody - Invitrogen) et anti-NSP ou anti-CP (**Di Mattia et al. 2020**) pour révéler la présence de la GST-PP et celle des protéines virales qui devraient y être associées. La GST seule a été utilisée comme contrôle négatif.

c. Résultats

L'ensemble des candidats validés par le système Y2H a été cloné dans pGex-3X et exprimé sous forme de protéines en fusion avec la GST dans les cellules BL21. Cependant, il s'est avéré difficile, voire impossible, d'induire efficacement la production de ces protéines dans cette souche de *E. coli*, possiblement parce que les peptides d'eucaryotes possèdent des codons (Codons : AGA, AGG, AUA, CCC, CGA, CGG, CUA, GGA, et UUA – **Chumpolkulwong et al. 2006**) rarement utilisés par les bactéries (procaryote). Nous avons donc transférés les plasmides dans la souche Rosetta II de *E. coli*. Celles-ci possèdent le plasmide DE3 permettant une meilleure production des protéines eucaryotes (**Jha et al. 2015**). Des Westerns-blots ont été réalisés sur les extraits de bactéries ayant poussé entre 20 et 28°C selon les peptides candidats (**Figure 2**). Bien que les contrôles aient montré que la GST est bien produite dans cette souche (**Figure 2Ba**), l'induction à 28°C n'a permis qu'une faible expression de GST-TMEM 256, GST-Reticulon, GST-Proton coupled amino acid transporteur et GST-ER membrane protein complex subunit 10 (**Figure 2Bb**). Nous avons alors testé d'autres température d'induction et, à 20°C, l'expression s'est montrée satisfaisante pour quasiment tous les GST-PP insuffisamment exprimés à 28°C (**Figure 2Bc**). Pour la GST-SCAMP, seule une faible bande était visualisable. Trois répétitions d'expression ont montré que la protéine était abondamment produite mais restait majoritairement associée aux débris cellulaires et était donc perdue lors des centrifugations de clarification des broyats (**Figure 2Bd**).

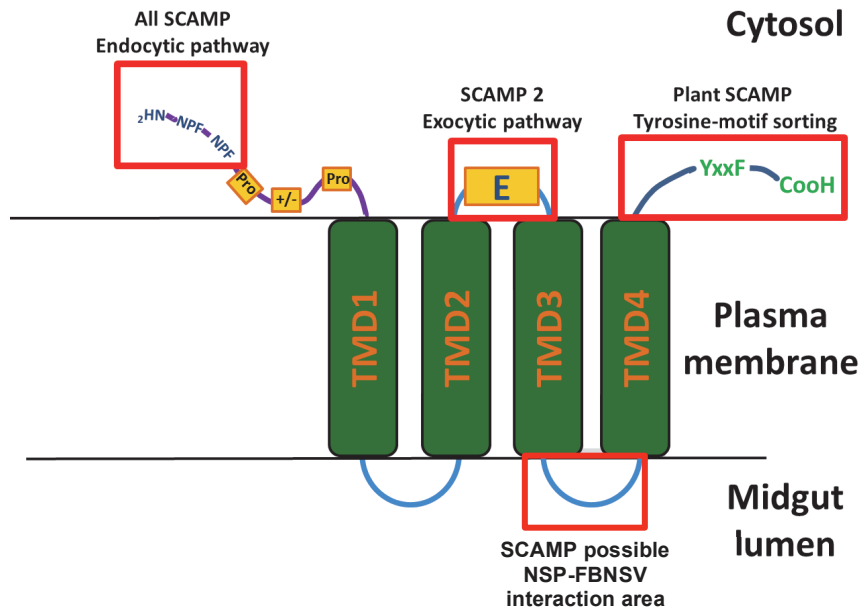


Figure 3. Schématisation d'une protéine de la famille SCAMP.

Chaque rectangle rouge montre un domaine fonctionnel impliqué dans une des voies de transport subcellulaire (adapté de **Law, Chow, et Jiang 2012**)

Au vu des difficultés à exprimer chaque candidat et des différentes spécificités de températures de croissance, nous avons décidé de nous limiter aux candidats sélectionnés sur la base des données bibliographiques: SCAMP (pour NSP) et réticulon (pour CP).

d. Discussion :

Interactions NSP-SCAMP

Pour confirmer l'interaction entre les protéines NSP et SCAMP, deux sources différentes de NSP ont été testées: (i) NSP produite dans la plante ou (ii) NSP produite en cellules d'insecte Sf9 à l'aide d'un baculovirus recombinant. L'interaction avec la NSP produite en plante n'a pas pu être observée (données non présentées). Cela peut s'expliquer par la difficulté d'extraire les protéines virales dans des conditions non dénaturantes à partir de plantes infectées ; difficultés liées à la très faible quantité produite lors de l'infection virale et à la forte oxydation des extraits de fève apparaissant très tôt après le broyage. La NSP produite dans le système baculovirus se retrouve majoritairement sous une forme insoluble qu'il n'a jamais été possible de solubiliser malgré le grand nombre de tampons différents testés (E. Pirolles, communication personnelle). Nous avons malgré tout décidé d'utiliser les extraits de cellules d'insecte, même si la quantité de protéine soluble était probablement faible. Malheureusement, il s'est avéré que la protéine NSP produite en cellules d'insecte se fixe directement sur les billes, de manière aspécifique, même en l'absence de GST-SCAMP (données non présentées). A ce jour, nous ne possédons aucune preuve expérimentale du fait que la protéine NSP produite dans le système baculovirus / cellules d'insecte soit bien fonctionnelle. Enfin, la majeure partie de la GST-SCAMP produite par les bactéries Rosetta II reste elle aussi insoluble (**Figure 2Bd**). L'ensemble de ces observations indiquent à l'évidence que le système GST pull-down n'est probablement pas l'approche qui nous permettra de valider/invalidier l'interaction NSP-SCAMP détectée en Y2H.

La séquence de SCAMP qui était présente dans le clone proie du système Y2H correspond à une partie comprise entre les domaines transmembranaires 3 et 4 de la protéine localisée du côté externe de la membrane (**Figure 3**).

Plus précisément, ce domaine comprend l'ensemble de la boucle extramembranaire et une partie des domaines transmembranaires 3 et 4 (**Law et al. 2012a**). La présence de ces derniers pourrait expliquer le fait que la GST-SCAMP se retrouve majoritairement dans le culot avec les débris membranaires des bactéries, ce qui constitue un problème récurrent pour les protéines possédant un domaine hydrophobe (**Bell et al. 2013**). Pour contourner cet écueil, la production du peptide sans ces parties transmembranaires est en cours de réalisation et devra être testée.

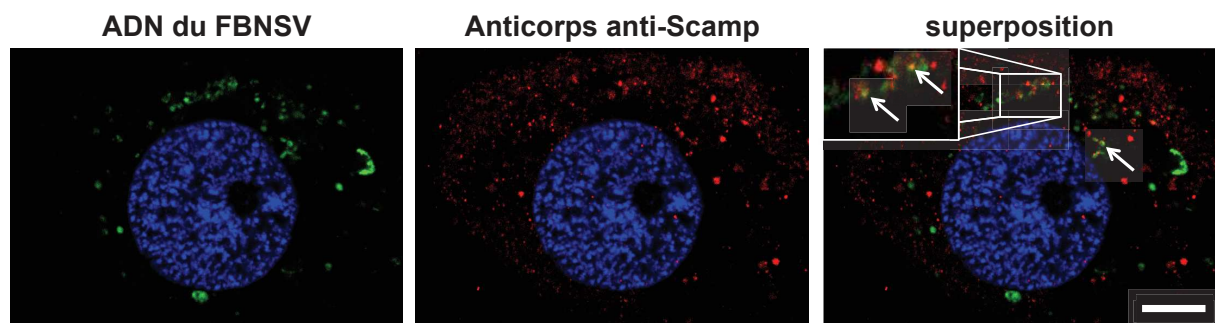


Figure 4. Marquage simultané de l'ADN du FBNSV (par FISH – vert) et de la protéine Scamp (immunolocalisation – rouge).
 Les noyaux cellulaires sont colorés en bleu au DAPI (longueur d'onde 360 nm). Les flèches blanches indiquent les agrégats cytoplasmique dans lesquels une colocalisation entre l'ADN viral et le signal lié à notre anticorps dirigé contre la protéine SCAMP est observable.

Interaction CP-Reticulon,

Aucune interaction n'a été observée du fait de l'absence de fixation de la GST-Reticulon sur la glutathione (données non présentées). Le manque de temps ne nous a pas permis d'aller plus loin dans la mise au point du protocole pour cette protéine.

La difficulté à obtenir (i) une expression correcte des différentes GST-PP (ii) des protéines virales fonctionnelles ainsi que (iii) des contrôles positifs d'interaction pour nos protéines virales, n'ont pas permis de confirmer les interactions détectées en double hybride. La GST est une molécule volumineuse (25 kDa) en comparaison des peptides proies testés (11 à 17 kDa). Il ne peut donc être exclu que le repliement secondaire de ces GST-PP entraîne dans certains cas le masquage de la zone d'interaction entre GST et glutathione fixé aux billes magnétiques ou entre le peptide proie et la protéine virale d'intérêt. Une option serait alors de fusionner les peptides proies à une molécule moins volumineuse que la GST. Par ailleurs, d'autres techniques « in vitro » peuvent permettre de valider ou non ces interactions, comme par exemple la co-immunoprécipitation (quelques essais préliminaires utilisant les GST-PP se sont cependant révélés négatifs), le Far-western ou la complémentation bi-moléculaire de fluorescence (BiFC). Faute de temps, toutes ces possibilités n'ont pu être mise en œuvre durant ma thèse.

4. Tentative de co-localisation de SCAMP et de l'ADN viral dans le puceron

a. Matériel et Méthode co-immunomarquage SCAMP-FBNSV.

Dans le cadre d'un stage de Master 1 réalisé par Mathilde Villegas (Univ. de Montp.), que j'ai co-encadrée, nous avons cherché à préciser la nature des vésicules dans lesquelles le FBNSV s'accumule dans les cellules de l'AMG. Pour cela nous avons entrepris de co-marquer l'ADN viral en FISH et la protéine SCAMP en immunofluorescence. L'anticorps SCAMP a été produit contre le peptide ADLLARKAELDRRQAELD, défini à partir de la séquence du gène SCAMP d'*A. pisum*. Les sondes utilisées pour le FISH contre l'ADN viral sont celles décrites dans le chapitre 1.

b. Résultats et discussions

Aucune bande n'est apparue sur les Western-blots réalisés pour tester l'anticorps anti-SCAMP en utilisant des broyats de pucerons *A. pisum*. Cependant, lors d'observations au microscope confocal d'intestins immuno-marqués avec ce même anticorps, il est apparu un marquage uniquement cytoplasmique, sous forme de petits agrégats dispersés, laissant penser que l'anticorps est fonctionnel (**Figure 4**).

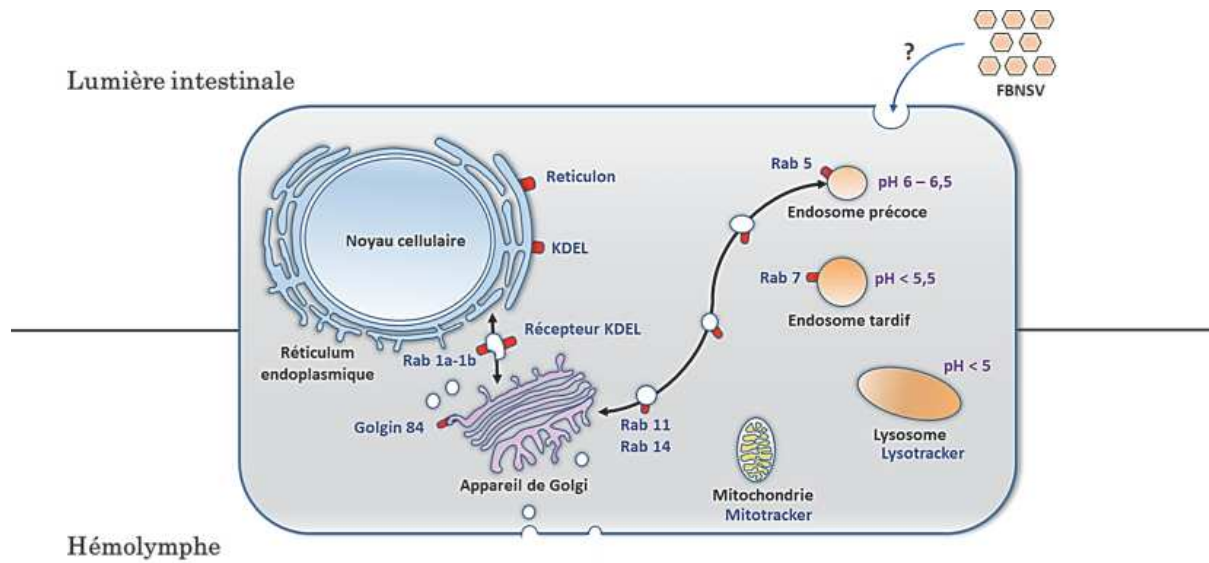


Figure 5. Schéma simplifié d'une cellule présentant les structures cellulaires ciblées durant cette étude.

Les cibles représentent soit un marqueur spécifique des structures cellulaires soit l'organite entier.

▣ : protéines ciblées sur chaque compartiment cellulaire. ↔ : transit des vésicules entre organites (Rapport de stage Mathilde Villegas)

Par la suite, un marquage simultané des protéines SCAMP et de l'ADN viral a été effectué pour observer si le virus se retrouve dans les structures comportant également la protéine SCAMP. Lorsque les pucerons sont élevés toute leur vie sur plantes infectées par le FBNSV, le marquage des 8 segments du FBNSV donne un signal très fort dans chaque cellule de l'AMG, ce qui pourrait masquer le marquage beaucoup plus discret des protéines SCAMP (cf. **chapitre 1, 2 et 3**). De ce fait, pour réduire l'accumulation de virus dans les intestins de pucerons et par conséquent l'intensité du marquage ADN-FISH, les pucerons n'ont été autorisés à acquérir le virus que durant trois jours sur plantes infectées. Cette modification du protocole s'est traduite par une réduction de l'intensité du signal dû au virus, ce qui a permis de visualiser quelques agrégats comportant une co-localisation de l'ADN viral et de la protéine SCAMP (**Figure 4**).

Des tests complémentaires n'ont pas encore pu être réalisés pour confirmer ces résultats prometteurs. Nous devons en particulier trouver les témoins adéquats pour i) prouver que notre anticorps détecte bien SCAMP et ii) vérifier qu'il est spécifique de SCAMP au niveau des cellules intestinales de puceron.

5. Recherche du trajet subcellulaire du FBNSV dans l'AMG de *A. pisum*

Cette partie est intégrée ici parce qu'elle correspond à la suite du travail de stage M1 de Mathilde Villegas. Elle peut toutefois aussi être considérée comme un complément au travail décrit dans le Chapitre 1

a. Introduction

Avec Mathilde Villegas, nous avons également cherché à mieux identifier le ou les compartiments subcellulaires dans lesquels le FBNSV circule chez *A. pisum*. Les résultats de ces travaux complètent ceux déjà rapportés dans différents chapitres de ma thèse (**chapitres 1 à 4**). Ils apportent des éléments supplémentaires pour identifier les vésicules dans lesquelles le FBNSV semble s'accumuler et ils pourraient à terme compléter les résultats du double hybride par la mise en évidence de structures où se localiseraient à la fois le virus et les candidats partenaires moléculaires de la CP et de la NSP.

Nous avons donc, à l'image des tentatives déjà décrites (**Watanabe et al. 2016**), essayé de marquer chez le puceron différents compartiments cellulaires dans lesquels le virus pourrait transiter : les vésicules de la voie endosomale, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les mitochondries et les lysosomes (**Figure 5 ; rapport de stage Mathilde Villegas**).

À ce jour, seul un petit nombre d'anticorps dirigés contre ces compartiments cellulaires sont signalés comme étant fonctionnels chez le puceron. Ces anticorps sont dirigés contre les protéines: KDEL, Rab7, β -tubuline (**Simonet et al. 2018**).

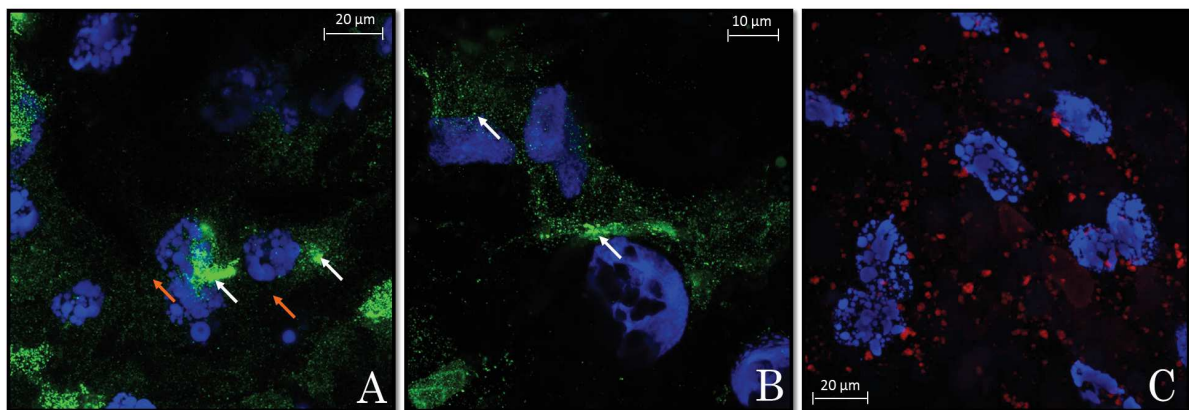


Figure 6. Localisation de protéines et d'organites impliqués dans la voie endocyttaire (endosomes précoces, tardifs et lysosomes) dans l'intestin moyen d'*A. pisum*.

Les noyaux cellulaires sont colorés en bleu au DAPI. Les protéines Rab 5 (A) et Rab 7 (B) sont visualisées en vert grâce aux anticorps secondaires couplés à l'Alexa fluor 488 (longueur d'onde 488 nm). Les flèches blanches représentent les marquages localisés à la surface des cellules de l'AMG. À l'inverse, les flèches orange indiquent les marquages considérés comme spécifiques parce que intracytoplasmiques. Les lysosomes (C) sont révélés par l'utilisation d'un réactif fluorescent en rouge (longueur d'onde 594 nm), le LysoTracker® qui cible les compartiments acides (Rapport de stage Mathilde Villegas).

Nous avons donc commencé par une phase exploratoire en testant des anticorps ou des réactifs fluorescents validés chez la drosophile ou chez certains vertébrés (**Tableau 5**). Lors de ces tests, seuls les marqueurs de structures cytoplasmiques ont été considérés, pour être testés ensuite lors des expériences de co-marquage avec le virus. Aucun marqueur nucléaire n'a été utilisé puisque le virus n'y est pas détecté. La technique d'immunomarquage sur les AMG d'*A. pisum* a été réalisée comme décrit dans le chapitre 1.

b. Résultats et discussions

Pour les marqueurs de la voie endocytaire, nous avons utilisé des anticorps dirigés contre les protéines Rab 5 (endosome précoce), Rab 7 (endosome tardif) et le réactif fluorescent Lysotracker (Invitrogen) (marquage des compartiments acides de la cellule et donc des lysosomes). Les anticorps anti-Rab 5 et 7 ont montré un fort marquage au niveau de la surface des cellules de l'AMG mais seul l'anticorps anti-Rab 5 permettait d'observer un faible marquage dans le cytoplasme. Le Lysotracker a également montré un marquage cytoplasmique satisfaisant (**Figure 6**).

Nous avons ensuite testé les anticorps dirigés contre des protéines cibles des voies endocytaires spécifiques des voies de recyclage vers la surface cellulaire: les protéines Rab 11 (associée aux vésicules de transport entre les endosomes précoces et le Golgi ou la membrane plasmique) et Rab 14 (associée aux vésicules de transport entre les endosomes précoces et le Golgi) ont été ciblés. Les anticorps anti-Rab 11 et anti-Rab 14 n'ont pas donné de marquage cytoplasmique et n'ont donc pas été retenus pour les expériences de co-localisation. Nous avons enfin testé des anticorps ciblant le réticulum endoplasmique (RE) ou l'appareil de Golgi. Les trois anticorps dirigés contre le RE sont (i) un anticorps anti-KDEL (motif présent sur les protéines adressées au RE) et (ii) deux anticorps dirigés contre l'isoforme 4 humaine du réticulon, celle-ci étant essentiellement présente à la surface des oligodendrocytes chez l'homme et agissant comme inhibiteur de la croissance des axones (**Yang et Strittmatter 2007**). Seul l'anti-corps anti-KDEL a montré un marquage cytoplasmique.

Deux anticorps (anti-Rab1a+1b et anti Anti-KDEL-receptor) dirigés contre des marqueurs des vésicules de transport entre le RE et l'appareil de Golgi ont été testés. Ils n'ont pas donné de marquage cytoplasmique. Un anticorps dirigé contre une protéine de l'appareil de Golgi, la golgin 84, a été testé, mais aucun marquage n'a été observé.

Le dernier marquage réalisé a été celui des mitochondries à l'aide d'un réactif fluorescent, le Mitotracker® (Invitrogen).

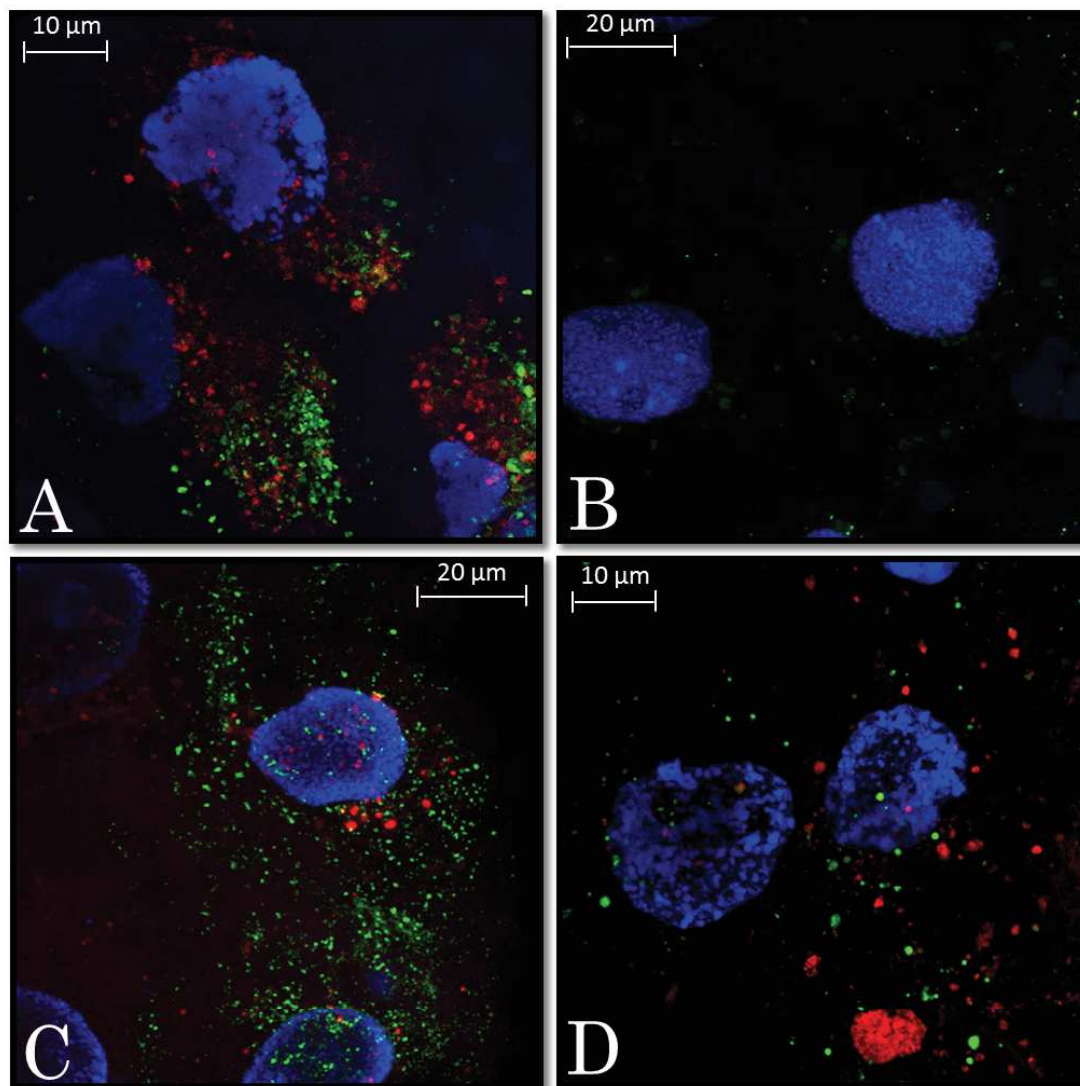


Figure 7. Co-marquage de la protéine virale NSP du FBNSV et de certains compartiments cellulaires (lysosomes, endosomes précoces, réticulum endoplasmique et mitochondries) dans les cellules intestinales d'*A. pisum*.

Les noyaux cellulaires sont colorés en bleu au DAPI (longueur d'onde 360 nm). Sur les photos montrant le co-marquage de la NSP et des lysosomes (A) ainsi que celui de la NSP et des mitochondries (D), la NSP est visualisée en vert grâce aux anticorps secondaires couplés à l'Alexa fluor 488 (longueur d'onde 488 nm) et les organites (lysosomes et mitochondries) sont révélés en rouge (longueur d'onde 594 nm) par l'utilisation du LysoTracker® et du Mitotracker® respectivement. Sur les images montrant le co-marquage de la NSP et des endosomes précoces ciblés grâce à l'utilisation de l'anti-Rab 5 (B) ainsi que celui de la NSP et du réticulum endoplasmique ciblé grâce à l'utilisation de l'anti-KDEL (C), La NSP est visualisée en rouge grâce aux anticorps secondaires couplés à l'Alexa fluor 594 (longueur d'onde 594 nm) et les organites sont révélés en vert par l'utilisation des anticorps secondaires couplés à l'Alexa fluor 488 (Rapport de stage de Mathilde Villegas)

Un marquage de nombreux points cytoplasmiques périnucléaires polarisés a été observé. Le Mitotracker a donc été validé pour une utilisation dans des expériences de co-localisation.

Les co-localisations ont été essayées avec d'une part les marqueurs sélectionnés précédemment (anti-Rab5, anti-KDEL, Mitotracker et LysoTracker) et d'autre part les anticorps anti-CP et anti-NSP (**Figure 7**). Les co-marquages impliquant les anticorps anti-CP n'ont pas fonctionné et n'ont pu être répétés par manque de temps. Les co-marquages anti-NSP n'ont montré aucune co-localisation entre protéines virales et organites ciblés (le co-marquage avec anti-NSP + anti-Rab5 n'a pas fonctionné, Figure 8B).

La majorité des anticorps que nous avons utilisés ont été produits pour réagir avec des protéines humaines ou de vertébrés pour lesquelles les homologies de séquence avec les protéines de pucerons sont variables. Nous n'avons donc eu aucun moyen de vérifier préalablement que les anticorps étaient spécifiques des organites ciblés chez *A. pisum*. Beaucoup des anticorps testés semblent donner des réactions non spécifiques chez *A. pisum* avec des marquages très présents sur la membrane plasmique ou situés juste au-dessus des cellules intestinales (marquage de fibres musculaires entourant l'AMG - **Ponsen 1972**).

Pour pouvoir aller plus loin, il sera important de produire des anticorps à l'aide de peptides correspondant aux séquences des marqueurs présents chez les pucerons afin de pouvoir cibler avec certitude chaque compartiment subcellulaire. Ces problèmes avaient également été rencontrés par d'autres auteurs lors de travaux visant à détecter le trajet subcellulaire du BBTV chez *P. nigronervosa*; lors de cette étude, aucun des marqueurs testés n'avait permis de visualiser une association du BBTV avec une structure particulière (**Watanabe, Borthakur et al. 2016**).

Tableau 5. Liste des anticorps/marqueurs testés chez les pucerons.

Anticorps / réactifs fluorescents	Référence	Cible	Hôte	Compagnie	Poly/monoclonal	Dilution utilisée
Anti-Rab5	AB1024-20	Endosome précoce	Chèvre	SIGGEN	Polyclonal	1 : 200
Anti-Rab14	AB0013-20	Transit Endosomes précoces - Golgi	Chèvre	SIGGEN	Polyclonal	1 : 200
Anti-Rab1a+1b	Ab192446	Transit RE - Golgi	Chèvre	Abcam	Polyclonal	1 : 200
Anti-KDEL-récepteur	Ab69659	Transit RE - Golgi	Souris	Abcam	Monoclonal	1 : 200
Anti-KDEL	Ab50601	Site fixation au RE	Rat	Abcam	Monoclonal	1 : 200
Anti-Rab7	Ab50533	Endosome tardif	Souris	Abcam	Monoclonal	1 : 200
Anti-Rab11	Ab3612	Transit Endosomes précoces - Golgi	Lapin	Abcam	Polyclonal	1 : 200
Anti-Reticulon	AR1	RE	Lapin	AR1	Polyclonal	1 : 100
Anti-Reticulon	AR2	RE	Lapin	AR2	Polyclonal	1 : 100
Anti-Golgin 84	Golgin 84	Appareil de Golgi	Souris	DSHB	Monoclonal	1 : 50
Lysotracker®	Lysotracker	Lysosome		Invitrogen		1 : 20 000
Mitotracker®	Mitotracker	Mitochondrie		Invitrogen		1 : 20 000

6. Conclusion

Les résultats obtenus grâce au système de double hybride en levure restent à confirmer. Comme mentionné précédemment, cette technique, à elle seule, présente de nombreux biais aussi bien pour la détection de candidats lors du screening de la banque d'ADNc que lors des validations de l'interaction en levure. C'est pour ces raisons que nous avons tenté de confirmer les interactions détectées en utilisant d'autres approches telles que le pull-down, la co-immunoprécipitation ainsi que l'immunolocalisation. Cependant, aucune de ces expérimentations n'a permis de confirmer les interactions obtenues par le système de double hybride. Néanmoins, l'absence de confirmation ne permet pas non plus de conclure à l'absence d'interaction. Il est possible que les difficultés à valider découlent de problèmes expérimentaux liés (i) à l'indisponibilité de protéines NSP ou CP purifiées et fonctionnelles (ii) à l'absence de témoins positifs d'interaction pour nos protéines virales et (iii) au manque d'anticorps/marqueurs fonctionnels chez les pucerons.

Durant ces expérimentations, nous nous sommes également heurtés au manque de données concernant la fonction des gènes chez les pucerons, nous amenant à choisir de tester des candidats sur la base de ce qui est connu chez des organismes assez éloignés, en particulier chez l'homme. Malgré cela, nous sommes parvenus à proposer un possible rôle pour chaque candidat, ainsi qu'une localisation intracellulaire probable, qui peuvent être considérés comme des hypothèses de travail pour la poursuite de ce programme.

La protéine SCAMP reste pour l'heure, un bon candidat pouvant jouer le rôle de récepteur pour le virus. Dans le Chapitre 3, nous avons établi que la protéine NSP peut compléter la transmission du FBNSV même quand elle est acquise après le virus. Cela pourrait faire penser à une stratégie à deux récepteurs (**cf. chapitre 3**) dans laquelle le réticulon correspondrait à un récepteur de la capsid (CP) et la SCAMP au récepteur du facteur assistant à la transmission (NSP). La possibilité de retrouver dans un même agrégat intracellulaire (résultats qui restent évidemment à confirmer) les segments viraux et la protéine SCAMP, combinée au fait que le système Y2H ait révélé de nombreux candidats jouant un rôle dans la voie d'endocytose et de dégradation (SCAMP, Proton coupled amino acid transporter-like protein et Transmembrane protein 165) (**Law et al. 2012a; Ögmundsdóttir et al. 2012; Potelle et al. 2017**), nous permet de faire des hypothèses sur une entrée et un transport subcellulaire du FBNSV via la voie endosomale. Selon cette hypothèse, le virus pourrait utiliser la voie endocyttaire lors de son entrée et échapper ensuite à la maturation classique de l'endosome précoce vers le lysosome, ou bloquer cette évolution, afin de limiter la dégradation des particules virales. Si l'on pousse le jeu de la speculation encore plus loin, on peut remarquer qu'un des candidats identifiés par Y2H est la protéine

transmembranaire 165 qui est impliquée dans l'acidification des lysosomes (**Potelle et al. 2017**).

La voie d'entrée via le transport endosomal serait ainsi commune à tous les virus transmis selon le mode circulant non multipliant (**Brault et al. 2007, Xia et al. 2018**). En outre, de nombreux candidats possiblement interactants de la CP pourraient jouer un rôle dans l'activation/inhibition de l'autophagie et de l'apoptose (ER membrane protein complex subunit 6, Proton coupled amino acid transporter-like protein, Reticulon) (**Li et al. 2013; Ögmundsdóttir et al. 2012; Wakana et al. 2005**). **Wang et al. (2016)** montrent que pour le *Tomato leaf curl virus* (TYLCV – *Geminiviridae*), l'activation de l'autophagie entraîne chez son vecteur, la mouche blanche, une diminution de la charge virale, mais également une augmentation de la transmission du virus. Un tel mécanisme pourrait également exister pour les nanovirus durant leur transmission.

La possible localisation simultanée de SCAMP et des segments viraux dans les mêmes agrégats ou vésicules est déterminante pour ces spéculations. Cette observation devra donc être confirmée. Les tests réalisés durant ma thèse et pendant le stage de Mathilde Villegas ont montré toute la difficulté de disposer d'anticorps fonctionnels ciblant les protéines de pucerons. Il faudra donc solutionner ce problème afin d'aller plus loin. La détermination du trajet subcellulaire du FBNSV en combinaison avec l'étude et la validation des interactions obtenues par Y2H reste un axe de recherche porteur, qui permettrait de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires qu'utilise le virus pour pénétrer et transiter dans les cellules de l'intestin moyen antérieur du vecteur.

7. Références hors article

- Bell, M. R., M. J. Engleka, A. Malik, et J. E. Strickler. 2013. « To Fuse or Not to Fuse: What Is Your Purpose? » *Protein Science* 22(11):1466-77. doi: <https://doi.org/10.1002/pro.2356>.
- Chumpolkulwong, N., K. Sakamoto, A. Hayashi, F. Irahara, N. Shinya, N. Matsuda, D. Kiga, A. Urushibata, M. Shirouzu, K. Oki, T. Kigawa, et S. Yokoyama. 2006. « Translation of "rare" Codons in a Cell-Free Protein Synthesis System from Escherichia Coli ». *Journal of Structural and Functional Genomics* 7(1):31-36. doi: 10.1007/s10969-006-9007-y.
- Fields, S., et O. k. Song. 1989. « A Novel Genetic System to Detect Protein-Protein Interactions ». *Nature* 340(6230):245-46. doi: 10.1038/340245a0.
- Jha, R. K., S. Chakraborti, T. L. Kern, D. T. Fox, et Charlie E. M. Strauss. 2015. « Rosetta Comparative Modeling for Library Design: Engineering Alternative Inducer Specificity in a Transcription Factor ». *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 83(7):1327-40. doi: <https://doi.org/10.1002/prot.24828>.

- Johnsson, N., et A. Varshavsky. 1994. « Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(22):10340–44.
- Law, A. H. Y., C. M. Chow, et L. Jiang. 2012a. « Secretory Carrier Membrane Proteins ». *Protoplasma* 249(2):269–83. doi: 10.1007/s00709-011-0295-0.
- Li, Y., Y. Zhao, J. Hu, J. Xiao, L. Qu, Z. Wang, D. Ma, et Y. Chen. 2013. « A novel ER-localized transmembrane protein, EMC6, interacts with RAB5A and regulates cell autophagy ». *Autophagy* 9(2):150–63. doi: 10.4161/auto.22742.
- Ögmundsdóttir, M. H., S. Heublein, S. Kazi, B. Reynolds, S. M. Visvalingam, M. K. Shaw, et D. C. I. Goberdhan. 2012. « Proton-Assisted Amino Acid Transporter PAT1 Complexes with Rag GTPases and Activates TORC1 on Late Endosomal and Lysosomal Membranes ». *PLoS ONE* 7(5). doi: 10.1371/journal.pone.0036616.
- Potelle, S., E. Dulary, S. Duvet, W. Morelle, D. Vicogne, C. Spriet, M. A. Krzewinski-Recchi, T. Marquardt, G. deBettignies, G. Matthijs, V. Lupashin, et F. Foulquier. 2017. « Manganese-induced trafficking and turnover of TMEM165 ». *The Biochemical Journal* 474(9):1481–93. doi: 10.1042/BCJ20160910.
- Simonet, P., K. Gaget, S. Balmand, M. Ribeiro Lopes, N. Parisot, K. Buhler, G. Duport, V. Vulsteke, G. Febvay, A. Heddi, H. Charles, P. Callaerts, et F. Calevro. 2018. « Bacteriocyte Cell Death in the Pea Aphid/Buchnera Symbiotic System ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(8):E1819–28. doi: 10.1073/pnas.1720237115.
- Wakana, Y., S. Koyama, K. Nakajima, K. Hatsuzawa, M. Nagahama, K. Tani, H. P. Hauri, P. Melançon, et M. Tagaya. 2005. « Reticulon 3 Is Involved in Membrane Trafficking between the Endoplasmic Reticulum and Golgi ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334(4):1198–1205. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.07.012.
- Watanabe, S., D. Borthakur, et A. Bressan. 2016. « Localization of Banana Bunchy Top Virus and Cellular Compartments in Gut and Salivary Gland Tissues of the Aphid Vector *Pentalonia nigronervosa* ». *Insect Science* 23(4):591–602. doi: 10.1111/1744-7917.12211.
- Yang, Y. S., et S. M. Strittmatter. 2007. « The reticulons: a family of proteins with diverse functions ». *Genome Biology* 8(12):234. doi: 10.1186/gb-2007-8-12-234.

**CHAPITRE 5 : MODE D'ACTION DES
FACTEURS ASSISTANTS DANS LES
DIFFERENTS MODES DE TRANSMISSION DES
VIRUS DE PLANTES PAR VECTEURS**

1. Mise en contexte

La découverte des facteurs assistants de la transmission (« helper component »– HC) date des années 1970 avec la mise en évidence de protéines virales non structurales indispensables à la transmission dans les genres *Potyvirus* et *Caulimovirus*. L'étude du HC des potyvirus (nommé HC-Pro) et du CaMV (nommé P2) a permis de proposer un mode d'action commun pour ces protéines par ailleurs très différentes (**Kassanis et Govier; Lung et Pirone 1973**). L'ensemble des travaux réalisés avant les années 2000 a conduit à définir les caractéristiques d'un HC : (i) il s'agit d'une protéine codée par le virus (ii) il est composé d'une seule ou d'un complexe de protéines non structurales (c'est-à-dire qui peuvent être éliminées lors de la purification des virions), (iii) il est nécessaire au succès de la transmission par vecteur et (iv) HC et virions peuvent être acquis séquentiellement par le vecteur (**Froissart et al. 2002**).

La revue qui fait l'objet de ce chapitre reprend l'historique de la découverte et de la description du mode d'action des deux premiers HC découverts. Elle fait aussi la synthèse des résultats plus récents obtenus sur les HC des virus transmis selon le mode de transmission circulant multipliant (**Lu et al. 2019**) et non multipliant. Même si la présence d'un HC chez les nanovirus est suspectée depuis 1999 (**Franz et al. 1999**), la démonstration que c'est le segment N qui code pour cette protéine (NSP) est très récente (**Grigoras et al. 2018**), et mes travaux de thèse ont permis de mieux comprendre son mode d'action. La revue qui suit intègre les résultats que j'ai obtenus et qui établissent pour la première fois qu'un HC peut permettre la transmission de particules virales acquises avant lui.

Nous discutons donc le fait que :

- i) Des HC sont maintenant décrits chez des virus transmis selon les trois modes de transmission connue (**cf. introduction**).
- ii) Même si nous ne sommes encore qu'au début de la caractérisation du mode d'action des HC des virus circulants, les données maintenant disponibles, incluant celles de ma thèse, permettent d'émettre de nouvelles hypothèses sur leur mode d'action.
- iii) De nouveaux travaux s'avèrent nécessaires pour tester ces hypothèses et pour décrire plus précisément le mode d'action de chacun des HC connus afin d'identifier les points communs et les spécificités de chacune de ces molécules qui se révéleront peut-être propres à chaque groupe viral voire à chaque mode de transmission.

2. Revue :

The helper strategy in vector transmission of plant viruses

Authors: Jérémy Di Mattia¹, Jean-Louis-Zeddami¹, Marilyne Uzest¹, Stéphane Blanc¹

¹: PHIM, INRA, CIRAD, SupAgro, Univ Montpellier, Montpellier, France

a. Introduction

Vector transmission is the mean by which most plant viruses (around 80% - (**Kassanis et Govier 1971; Lung et Pirone 1973**)) ensure plant-to-plant transfer, and thus maintenance and spread in the environment. Any organism feeding on/in plants and capable of moving from one plant to another can uptake and release viruses and can thus potentially act as a vector. Very diverse organisms (protists, nematodes, mites and insects) have been reported as efficient vectors, but sap feeding hemipteran insects encompassing plant hoppers, leaf hoppers, and particularly whiteflies and aphids are by far the most important (**Nault 1997, Ng and Perry 2004, Hogenhout, Ammar et al. 2008**). The mechanisms of virus-vector interaction are also very diverse and have been extensively studied in these hemipteran insects, which are thus the major focus of this review. However, the current classification of the transmission modes that have been defined and characterized can accommodate cases of transmission by all types of vectors, including mites, nematodes and even protists (**Blanc 2008**).

The two major transmission categories are named non-circulative and circulative (**Blanc, Drucker, Uzest 2014**). The non-circulative transmission qualifies cases where the plant-vector interaction is exclusively external. In hemipteran vectors, the virus reversibly binds to the mouthparts and/or the foregut, where it can be retained for a short time (few minutes to hours) and rapidly inoculated to another plant upon salivation or regurgitation. In contrast, the circulative transmission corresponds to cases where the interaction is internal. In hemipteran vectors, this means that the virus crosses the gut and circulates within the insect body to reach the salivary glands and ultimately the saliva. Whatever the details of this cycle, it involves an initial specific recognition and the crossing of one or several cellular barriers (at least gut and salivary glands) to accumulate within and be secreted out of the vector. The consequences are the existence of a latent period between acquisition and inoculation, and also, in all reported cases, a high and long-lasting accumulation of the virus that can be transmitted for the whole vector's life span (**Blanc, Drucker, Uzest 2014**). The circulative transmission is divided in the propagative and non-propagative sub-categories depending on

whether the virus replicates or not during its cycle within the vector (**Blanc and Gutierrez 2015**).

Regarding molecular interactions with the vector, plant viruses have seemingly evolved two distinct strategies, the “capsid strategy” and the “helper strategy” (**Pirone and Blanc 1996**). In the capsid strategy, the virus particles are necessary and sufficient to ensure the specific recognition of the vector. The experimental demonstration came from the capacity of the corresponding viruses to be directly acquired from suspensions of purified virus particles, without any other viral proteins, and later transmitted to healthy host plants (**Pirone 1964**), demonstrating that the coat protein alone can control attachment (and cycle) within the vector. However, all viruses are not transmissible this way. In addition to the virus particle, a virus-encoded non-structural protein is mandatory for the helper strategy. A large number of viral species have been shown to require such additional proteins that have been designated “helper components” (HC). Since the first case report for a species of the genus *Potyvirus* (**Kassanis and Govier 1971b**), HCs have been described in many other non-circulative virus genera and the helper strategy proved dominant in this transmission category (**Syller 2006**). Because HCs of unrelated viruses have no sequence homologies, a specific definition has been provided by (**Froissart et al. 2002**): “a HC can be any compound complying with all of the following criteria: (i) it is virus-encoded, (ii) it can be one or a complex of several non-structural molecules (i.e., which can be eliminated upon purification of virions), (iii) it is necessary for the success of vector transmission, and (iv) HC and virions can be acquired sequentially by the vector”.

Until today, the HCs from unrelated viruses were thought to have the same mode of action, illustrating a convergent evolution, although the selective advantage they may provide remains totally speculative (**Pirone et Blanc 1996; Froissart et al. 2002**). Also, one unexplained longstanding observation was the fact that the helper strategy appears frequent in non-circulative transmission but extremely rare in circulative transmission (**Franz et al. 1999**). Recent advances are challenging these views by showing that the helper strategy appears widespread in all transmission categories (**Grigoras et al. 2018, Lu et al. 2019, Di Mattia et al. 2020**), and that distinct HCs may have different modes of action (**Di Mattia et al 2021, in prep, Chapitre 3**). In this review, we confront the historical context and the recent discoveries, and we discuss how this wealth of knowledge indicates that HCs may have evolved for diverse reasons in distinct viral clades.

b. An historical perspective on the discovery of helper components

The discovery of HCs and the characterization of their mode of action results exclusively from studies of non-circulatively transmitted viruses. Indeed, as already mentioned above, that the helper strategy also exist in circulative viruses is a very recent finding; it is poorly characterized and will be discussed in a later specific section.

The first hint on the discovery of HCs came from (**Pirone and Megahed 1966**) who observed that purified particles of *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) or *Turnip mosaic virus* (TuMV) were not transmissible, when acquired through parafilm membranes by aphid vectors. At that time the explanation was unclear and could as well be attributed to partial degradation of virions during the purification process. However, about five years later, key complementary information was reported on the same viral genera. In a series of experiments based on sequential acquisition of transmissible and non-transmissible natural isolates, Govier & Kassanis, and in parallel Lung and Pirone, respectively set the basis of the concept of HC for potyviruses (*Potato virus Y*, PVY) and caulimoviruses (CaMV) (**Table 1**). These authors first demonstrated that a non-transmissible isolate could be efficiently transmitted by aphids previously fed on a plant infected with a transmissible isolate of the same viral species (**Kassanis and Govier 1971a, Kassanis and Govier 1971b, Lung and Pirone 1973**), and that the reverse acquisition sequence did not work. These experiments pointed to the existence of a helper factor that would be produced in the plants infected by the transmissible isolate. Such a helper factor could be acquired first by aphids and somewhat be retained and “wait” somewhere in the alimentary tract to complement the transmission of the secondarily acquired non-transmissible isolate. The same authors consistently showed that the transmission of purified virus particles of both poty- and caulimoviruses could be rescued by pre-feeding aphids onto plants infected with a transmissible isolates (**Govier and Kassanis 1974, Lung and Pirone 1974**). Potyvirus-infected plant extracts deprived of virus particles by ultracentrifugation contained HC activity, indicating that the HC is not the virus particle of the transmissible isolate itself (**Govier and Kassanis 1974**). Additional chemical, biochemical and immunological treatments of potyvirus-infected plant extracts further demonstrated that the HC is a non structural protein produced upon infection of plants by a transmissible isolate (**Govier et al. 1977**). Antisera directed against viral proteins produced from cell-free translation of viral RNA provided the first hint that the HC is virus-encoded by specifically blocking its activity in infected plant-extracts (**Thornbury and Pirone 1983**). The copurification of potyviral HC activity and of a viral polypeptide of around 50 KDa further pointed in the same direction (**Thornbury et al. 1985**). However, it was not before the development of molecular biology, particularly the

sequencing technology and the production of infectious clones allowing reverse genetic approaches, that the viral origin of HCs could be definitely and directly proven.

Potyvirus

The genome of potyviruses is a ss(+)RNA encoding one single large polyprotein precursor, post-translationally cleaved in ten polypeptides each with one or more specific functions (**Allison et al. 1985, Domier et al. 1986, Dougherty and Carrington 1988**). The polypeptide co-purifying with the HC activity (**Thornbury et al. 1985**) was identified as the second from the N-ter of the polyprotein (**Carrington et al. 1989**). Because it also possesses a protease activity, releasing it from the precursor large polyprotein, it was named the helper component proteinase (HC-Pro) (**Carrington et al. 1989**). Comparison of HC-Pro sequences from transmissible and non-transmissible species and isolates pointed at differences in two key regions. The first is located in the N-ter region (AA positions 50-54) where a conserved “KITC” motif is mutated to EITC in non-transmissible isolates (**Thornbury et al. 1990, Granier et al. 1993, Canto et al. 1995**). The second is located in the central region (AA positions 308-310) where a conserved “PTK” motif is mutated to PAK in non-transmissible isolates (**Huet et al. 1994**). The key role of both motifs in HC activity has been thoroughly confirmed by reverse genetics where the introduction of these mutations in transmissible infectious clones always abolished their capacity to be transmitted by aphids (**Atreya et al. 1992, Atreya and Pirone 1993, Huet et al. 1994**).

Caulimovirus

The comparison of CaMV sequences revealed that the non-transmissible isolate CM4-184 harbors a 421 bp deletion in the coding region II (gene II) (**Howell and Hull 1978, Howarth et al. 1981**). These authors thereby established that gene II was dispensable for plant infection, pointing at its specific function in aphid transmission. This was soon confirmed by the demonstration that deletion and/or mutation of this genome region in transmissible CaMV isolates were associated with the loss of transmissibility (**Armour et al. 1983, Daubert et al. 1983, Woolston et al. 1983, Woolston et al. 1987**). The product of gene II, the protein P2, has then been produced in the heterologous baculovirus/insect cell system (**Espinoza et al. 1992**) in a biologically active form able to complement the transmission of CaMV non-transmissible isolates acquired from infected plants or crude extracts thereof (**Blanc et al. 1993**). Intriguingly, this heterologous-expressed P2 failed to complement the transmission of purified CaMV particle, suggesting the possible requirement for an additional unknown factor (**Blanc et al. 1993**). Finally, this additional compound was identified as the viral protein P3 (product of gene III) that must be present in the purified CaMV particle

suspension for successful complementation of aphid-transmission by the previously acquired P2 (**Leh et al. 1999**). Thus, two non-structural proteins, P2 and P3, assist the vector transmission of CaMV. However, while P2 meets the four criteria defining a HC (**Froissart et al. 2002**), P3 does not. Indeed, its acquisition together with CaMV virions is mandatory for successful vector transmission (**Drucker et al. 2002**). As P3 cannot be acquired separately from virions, it cannot be qualified as a HC.

While the helper strategy has been extensively studied for the genera *Caulimovirus* and *Potyvirus*, it has also been reported in other genera of the family *Potyviridae*, as for example the *Ipomovirus* transmitted by whiteflies (**Stenger et al. 2005, Stenger et al. 2006, Young et al. 2007**) and *Tritimovirus* transmitted by mites (**Colinet et al. 1998**)(**Table 1**). The requirement of HC molecules has even been evidenced in the genus *Tobravirus* transmitted by nematodes in a non-circulative manner (**MacFarlane et al. 1999**)(**Table 1**). Hence, helper components appear to have evolved in very unrelated viruses transmitted non-circulatively by very distinct vectors. Unfortunately, in depth characterization of their mode of action remain limited to a few emblematic cases within the poty- and caulimoviruses.

c. Modes of action of helper components

The repeated observation that successful transmission resulted either from the concomitant acquisition of the HC and virus particle, or from their sequential acquisition solely if the HC is acquired first, allowed the pioneer research groups working on potyviruses (**Kassanis and Govier 1971a, Kassanis and Govier 1971b**) and caulimoviruses (**Lung and Pirone 1973, Lung and Pirone 1974**) to propose an hypothesis describing the mode of action of HCs. The HC would specifically bind to a receptor molecule within the vector and to the virus particle or to a viral partner fixed on the virus particle (see below for the CaMV), through distinct functional domains, thereby creating a molecular link between the two. This hypothesis, later named the “bridge hypothesis” (**Pirone and Blanc 1996**) soon became widely accepted and, so far, nearly all empirical investigations on the question yielded supportive results. Interestingly enough, however, very recent data on the existence of HCs in circulative viral species is casting doubts or at least calling for nuances and careful reexamination (see the dedicated section IV).

i. Helper component – virus particle interaction

Potyvirus

As indicated in the previous section, reverse genetic approaches identified two important domains of the potyviral HC-Pro, respectively containing the motifs KITC and PTK. In parallel, comparison of coat protein sequences pointed out at a highly conserved amino acid triplet DAG that appears to be mutated to DAE in some of the analyzed non transmissible isolates (**Harrison and Robinson 1988**). Directed mutagenesis in infectious clones of various potyviral species, changing the triplet DAG to DAE, systematically resulted in the loss of aphid-transmissibility (**Atreya et al. 1990, Gal-On et al. 1992, Atreya et al. 1995**). Noticeably, the DAG motif is located at the N-ter of the coat protein, in a region predicted to be accessible at the surface of virus particle, thus potentially available for binding to HC-Pro (**Shukla and Ward 1989**). The experimental demonstration of a direct interaction between HC-Pro and the capsid of *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) was obtained using a protein blotting-overlay protocol where the HC-Pro extracted from infected plants was assessed for specific binding onto full length or truncated coat protein. HC-Pro was shown to interact with a 7 amino acid sequence (DTVVDAGK) encompassing the DAG motif, and this interaction was totally abolished by the DAE mutation. Several amino acid substitutions were performed within the DTVVDAGK sequence and used to demonstrate a perfect correlation between HC-Pro/coat protein binding and successful aphid transmission (**Blanc et al. 1997**)(Figure 1). The HC-Pro-CP interaction was then reported for other potyviruses (**Peng et al. 1998**) and the PTK amino acid triplet identified as the HC-Pro motif recognizing the DAG of the coat protein (**Peng et al. 1998**)(Figure 1). Further experimental evidence came from a study on the specificity of the binding between HC-Pro and CP. The HC-Pro of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) cannot complement the transmission of TuMV particles, and *vice versa*. Replacing the N-terminal region of the coat protein of ZYMV by that of TuMV allowed the aphid transmission of the recombinant virus complemented by the HC-Pro of TuMV (**Dombrovsky et al. 2007**). This result strongly suggested that the N-terminal region of the CP containing the DAG motif is the sole determinant of the binding of potyvirus particles to HC-Pro (Figure 1).

Caulimovirus

Protein overlay assays demonstrated a more complex situation for CaMV (**Schmidt et al. 1994**). The HC (the protein P2) efficiently attached virions from infected plant crude extracts but not from purified virus suspensions. The mandatory additional component eliminated upon purification was later found to be the viral protein P3 (**Leh et al. 1999, Leh et al. 2001, Drucker et al. 2002**) that decorates virus particles, with its C-terminal part deeply anchored into pores opened in between capsid hexamers, and its N-terminal part exposed at the surface and binding to P2 (**Plisson et al. 2005, Hoh et al. 2010**) (Figure 1). It is remarkable

that P3 adopts a tetrameric parallel conformation when free in solution and a very different one when anchored to the virion, and that only the latter conformation has an affinity for a functional multimeric form of P2 (**Hébrard et al. 2001, Hoh et al. 2010**). These studies further determined that the virion-bound P3 forms a network of N-terminal antiparallel coiled-coil dimers that bind to a coiled coil trimer of the C-terminal moiety of P2 (Figure 1; for details see (**Hoh et al. 2010**) and references therein).

ii. Helper component – aphid receptor interaction

Potyvirus

In the case of potyviruses, seminal work by Bradley and Ganong (**Bradley and Ganong 1955a, Bradley and Ganong 1955b**) showed that irradiation, or chemical treatment with formaldehyde, of the stylet's tip of viruliferous aphids inhibited subsequent inoculation of PVY, suggesting that the infectious virus material was retained at the corresponding location. Consistently, autoradiography of aphids that had acquired labeled virions as well as optical and electron microscopy showed that, though potyviruses are detected throughout the alimentary tract, they are mainly retained in at the distal tip of the aphid stylets bundle (**Ammar 1994, Wang et al. 1996**). Transmission assays with various potyviruses and aphid species demonstrated that the transmission success depends largely on the HC-Pro/aphid species combination, and this was considered a first indication of the probable existence of specific receptors of HC-Pro within aphid stylets (**Wang et al. 1998**).

We here again refer to the two conserved amino acid motifs, KITC and PTK, respectively located in the N-terminal and central regions of HC-Pro. While, as indicated above, mutations in the PTK motif abolish the binding to the coat protein (**Huet et al. 1994**), changes in KITC motif (and even in a larger N-terminal domain) do not but instead impair retention within the stylets (**Blanc et al. 1998**)(Figure 1). Biochemical and structural analysis of HC-Pro revealed its capacity to self-interact and form oligomers (**Thornbury et al. 1985, Plisson et al. 2003, Ruiz-Ferrer et al. 2005**). Ruiz-Ferrer and colleagues (Ruiz-Ferrer, **Boskovic et al. 2005**) further speculated that this oligomerization drives a geometrical arrangement and generates two functional domains, which could respectively bind to virion and to a receptor in the stylets.

An elegant study, combining the electrical control of aphid feeding behavior and transmission testing, demonstrated that the acquisition of a potyvirus is associated to ingestion of infected plant cell content, whereas the inoculation is associated to salivation (**Powell 2005**). The food canal where the sap is streaming up and the salivary canal where the saliva is streaming down are separated all along the stylets but at the extreme distal tip

where they fuse to form the “common canal”. The authors thus logically concluded that the HC-Pro-virion complexes should be retained in the common canal, because it is the only location in contact with both ingested plant material and ejected saliva. Despite the fact that all available results are compatible with the bridge hypothesis (**Dombrovsky et al. 2007, Fernandez-Calvino et al. 2010, Kamangar et al. 2019**), the identity and even the location of the receptor of HC-Pro within the common canal remains elusive. Stylets being cuticular tissues, cuticular proteins are of course expected to play a role in potyvirus binding and represent the best receptor candidates, but the proof is still lacking.

Caulimovirus

Just as for potyviruses, the domain of the CaMV P2 that recognizes the putative receptor within the aphid stylets has been localized by mutagenesis approaches in the N-terminal domain of the protein. In particular, the identity of the residue at amino acid position 6 appears to be key for aphid/virus recognition. In the CaMV Cabb-BJI isolate, replacement of the glutamine at this position by other residues differentially affected the transmission efficiency by distinct aphid species. One of these mutants, where a tyrosine substituted for the glutamine, named mutant P2-Rev5, could no longer be transmitted by any aphid species (**Moreno et al. 2005**).

A major advance in this field of research came from the development of an efficient in vitro binding assay between the heterologously-expressed CaMV P2 and dissected aphid maxillary stylets (**Uzest et al. 2007**). This system confirmed that the P2-Rev5 mutant does not bind to the stylets whereas the wild type P2 is specifically retained within the common canal, onto an unforeseen cuticular structure that has been named the “acrostyle” (**Uzest et al. 2010**)(Figure 1). Initially reported as displaying cuticular proteins at its surface, the acrostyle has been further characterized and its proteome is now available (**Webster et al. 2017, Webster et al. 2018, Deshoux et al. 2020**). Of important note is the identification of proteins from the CPR and CPAP3 families, named Stylin-01 to Stylin-05, that have one of their domain emerging and thus accessible at the surface of the acrostyle (Figure 1). All of these proteins stand as prime receptor candidates for non-circulative viruses and, consistently, Stylin-01 was shown to be involved in CaMV transmission and has been proposed to act as receptor for this virus (**Webster et al. 2018**)(Figure 1). Unfortunately, cuticular proteins are very difficult to handle. Their biochemical and structural properties are thus virtually unknown, and further effort is needed to achieve heterologous production in a correctly folded and fully functional form. This technical bottleneck has been holding for decades, and has thus far precluded the definitive validation of HC–receptor interaction. Breaking this lock would pave the way for the search of receptors of potyviruses and/or

cucumoviruses, potentially among the Stylins described in the acrostyle, and for the development of antagonistic compounds able to specifically block virus-vector interactions.

As indicated earlier, studies of the HC mode of action in non-circulative virus clades other than caulimo- and potyviruses are scarce. To briefly mention in the frame of this review, the reports on HC-Pro in distinct genera of the family *Potyviridae*, transmitted by whiteflies or even mites, all assume a mode of action similar to that in the genus *Potyvirus* transmitted by aphids (Colinet *et al.* 1998, Stenger *et al.* 2005, Stenger *et al.* 2006, Young *et al.* 2007). Likewise, investigation of the mode of action of the HC in tobnaviruses indicated that virus particles can be retained in the anterior part of the feeding apparatus of nematode vectors only when a compatible HC is also present and associated to virions, again supporting the bridge hypothesis (MacFarlane *et al.* 1999, Vassilakos *et al.* 2001).

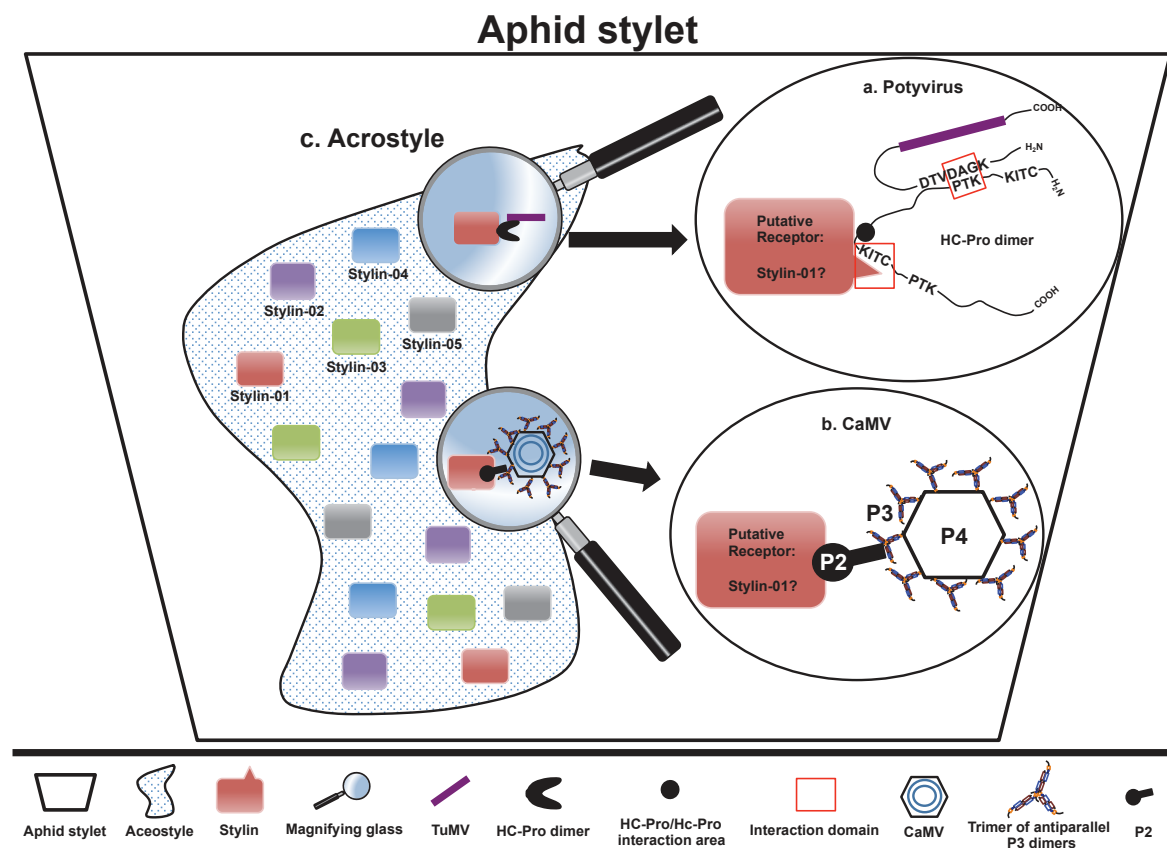


Figure 1: Schematization of the HC mode of action for noncirculative viruses transmitted by aphids.

At the tip of the aphid stylets, the acrostyle harbors cuticular proteins named Stylins (left). All known Stylet-HC-virus particles interactions and the involved protein domains (when identified) are detailed on the right.

iii. Transmission activation

At least the two best-studied groups of non-circulative viruses, potyviruses and caulimoviruses, have evolved a remarkably sophisticated cellular response to the feeding of

the insect vectors on infected plants. This response results in the immediate formation of specific viral transmission morphs that are efficiently acquired by the vectors. In both cases, the helper component is a key player of this phenomenon that has been called “Transmission Activation” (TA; **(Drucker and Then 2015)**).

Within infected plant cells, the three components of the CaMV transmissible complexes, P2, P3 and virions, are separated in distinct compartments. The immense majority of the virus particles are accumulated, most likely as P3-virion complexes, in several electron-dense inclusions that have been identified as the viral factories. P2 is not detectable in these viral factories. Instead, P2 entirely accumulates in one unique electron-lucent inclusion per infected cell, that also contain P3 and a few scattered virions (**Drucker et al. 2002**), and that is designated the transmission body (TB). A series of studies uncovered a phenomenon where the CaMV can reversibly produce functional transmissible complexes, precisely when needed, when aphids puncture plant cells and ingest a minute amount of their content (**Martinière et al. 2009, Bak et al. 2013, Martinière et al. 2013**). Upon puncturing an infected plant, the stylets and/or secreted saliva trigger a plant response, likely involving calcium fluctuation and ROS production, which is immediately hijacked by the virus. Within less than ten seconds, the TB is first loaded with tubulin and then disintegrates and disperses P2 all over the cell cytoplasm onto the microtubule network (**Martinière et al. 2013**). Within the same short time frame, P3-virion complexes are expelled from the viral factories and also totally cover the microtubule network, likely associating with P2 (**Bak et al. 2013**). The authors showed that transmissible complexes thereby become accessible all over the cell probed by an aphid vector, and further demonstrated that the situation reversed to the initial stage within 5 minutes of aphid departure, with the reconstitution of genuine TB (**Martinière et al. 2013**) and virion-loaded viral factories (**Bak et al. 2013**).

A comparable observation has been reported by the same research group for potyviruses (**Berthelot et al. 2019**). While the phenomenon of transmission activation can be considered analogous, the molecular/cellular processes involved are totally distinct (**Berthelot et al. 2019**). In this case, both the virus particles of TuMV and the HC-Pro are homogeneously distributed over the cytoplasm of infected plant cells. The signal of the aphid puncture and its transduction by the plant, possibly also involving calcium spiking and ROS production, induces an immediate oligomerization of HC-Pro, and this conformational change appears to promote the formation of HC-Pro-virion complexes within the cell. The same study again demonstrates that this phenomenon is reversible after a few minutes from the triggering signal, with disappearance of the oligomeric forms of HC-Pro within infected tissues.

In the two cases, one may wonder why a virus would adopt such a complex “behavior” when a constitutive production of transmissible complexes in infected tissues would appear easier and efficient. The explanation provided by the authors is that viral proteins are often multifunctional and have many duties to fulfill. For example, CaMV-P3 complexes also bind to P1 for cell-to-cell and long-distance movement within the plant (**Stavolone et al. 2005**) and the domain of P3 involved in binding to P1 is the same as that binding to P2. The HC-Pro of potyviruses has multiple functions (**Valli et al. 2018**), many of which may not be compatible with the oligomeric form binding to the virus particles upon aphid punctures. In simple words, the transmissible complexes may interfere with other step of the viral life cycle and their transient appearance just when needed may alleviate the problem.

Whether TA is a general phenomenon that could be extended to the transmission of many others viral species is a formidable avenue of research in the near future, even beyond plant virology (**Blanc et al. 2014**). Likewise, whether it is limited to non-circulative transmission and more specifically whether HC molecules should always be involved is also a relevant and stimulating question.

iv. The helper strategy in circulative viruses

The helper strategy has long been believed to be restricted to the non-circulative transmission, though no explanation could be provided beyond the plain observation. There was one report, mentioning the involvement of an HC in the aphid transmission of a nanovirus (Genus *Nanovirus*, Family *Nanoviridae*; **Franz et al. 1999**), but the molecular details were not investigated for nearly two decades. This uncharacterized HC controlling the transmission of a circulative non-propagative nanovirus thus remained the exception confirming the rule until very recently. The discovery of the involvement of a HC in the leafhopper transmission of the circulative propagative Rice stripe virus (RSV, genus *Tenuivirus* Family *Phenuiviridae*, Order *Bunyavirales*), however, definitely confirmed that a helper strategy can evolve whatever the category of virus-vector interaction (Table 1). An interesting and timely question is now whether the bridge hypothesis stands as the universal mode of action of HCs.

Tenuiviruses

Most members of the order *Bunyavirales* have a lipid envelope associated with two glycoproteins Gn and Gc involved in membrane fusion and entry into host cells (**Guardado-Calvo and Rey 2017**). Tenuiviruses appear to have lost their lipid envelop but still produce the two glycoproteins, which are in this case non-structural proteins respectively named NSvc2-N and NSvc2-C (**Chen et al. 2019**), deriving from the cleavage of the precursor

glycoprotein NSvc2. The non-enveloped virus particles appear as filamentous ribonucleoproteins (**Toriyama 1986**) and, interestingly, they cannot be transmitted by their plant hopper vectors when purified (**Lu et al. 2019**). The adjunction of the two glycoproteins to purified ribonucleoproteins efficiently rescued the vector transmission of rice stripe virus (**Lu et al. 2019**). The same authors further demonstrated that the two proteins can interact with the virus particle. NSvc2-N connects it to a putative receptor at the surface of the insect gut cells and triggers endocytosis. NSvc2-C subsequently allows the release of the virion-NSvc2-N complex from endosomes into the cytosol, presumably through a membrane fusion activity whose precise mode of action remains elusive in the specific case of tenuiviruses (**Lu et al. 2019**)(**Figure 2a**).

These results are seemingly compatible with the bridge hypothesis, at least for NSvc2-N (**Yao et al. 2014**), but some aspects need further investigations. In particular, it is unclear whether NSvc2-C can be acquired sequentially or whether a co-acquisition with the virion and/or NSvc2-N is mandatory. Because Gn and Gc of bunyaviruses are generally forming heterodimers (**Hepojoki et al. 2010**), it would also be interesting to test a possible co-acquisition of NSvc2-N and NSvc2-C as a unique complex that could complement the ulterior acquisition and transmission of purified viral particles.

Nanoviruses

Analogous to approaches earlier developed for non-circulative poty- or caulimoviruses (see section b), Franz and coworkers discovered that the aphid transmission of purified *Faba bean necrotic yellows virus* (FBNYV, genus *Nanovirus*) particles was not possible, unless the aphid vectors were previously fed on a plant infected by a transmissible isolate (**Franz et al. 1999**; Table 1). Similar pre-feeding on an infected plant was also required for the transmission of purified viral particles directly injected into the aphid hemolymph. Although its viral origin was not proven, the authors concluded that a HC was most likely produced in infected plants and necessary for the virus to cross the gut and salivary gland cell barriers. Unfortunately, both the identity and the mode of action of this putative HC remained unexplored after this seminal work, even long after infectious clones of nanoviruses became available.

The family *Nanoviridae* regroups viruses composed of six (genus *Babuvirus*) or eight (genus *Nanovirus*) ssDNA genomic segments, individually encapsidated in distinct viral particles and each encoding a single protein (**Gronenborn 2004**). The infectious clones could be successfully produced for several member species of the genus *Nanovirus* (**Timchenko et al. 2006**, **Grigoras et al. 2009**, **Grigoras et al. 2014**, **Grigoras et al. 2018**), but so far failed

for babuviruses. Because of the nature of these infectious constructs, one clone per genomic segment, these authors realized that some segments could be omitted upon inoculation without compromising the systemic infection of host plants (**Timchenko et al. 2006, Grigoras et al. 2018**). They were then able to demonstrate that in the absence of the segment N, the host plant appeared systemically infected but aphid transmission from this plant was impossible (**Grigoras et al. 2018**). Modifications of the start codon or coding sequence further showed that the HC of nanoviruses is not the segment N itself but its encoded NSP protein (**Grigoras et al. 2018, Di Mattia et al. 2020**).

The localization of the coat protein of banana bunchy top babuvirus in its aphid vector indicated that the virus accumulates at only two locations, the anterior midgut and the principal salivary glands (**Bressan and Watanabe 2011, Watanabe and Bressan 2013**). Di Mattia and co-workers (**Di Mattia et al. 2020**) recently re-investigated this localization for *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV, genus *Nanovirus*), in the presence/absence of the segment N. Not only did they observe that this segment was mandatory for the internalization of the virus and its accumulation in the aphid gut cells, but also that the NSP protein colocalized therein with both viral DNA and coat protein. This observation is reminiscent of that described for NScv2-N of tenuiviruses (**Lu et al. 2019**) and again compatible with the bridge hypothesis. The NSP protein may attach to the viral particles on one side and to a gut (and/or salivary gland) cell receptor on the other side and trigger the endocytosis of the complex (**Di Mattia et al. 2020**). However, incongruent observations are casting doubts (Figure 2b).

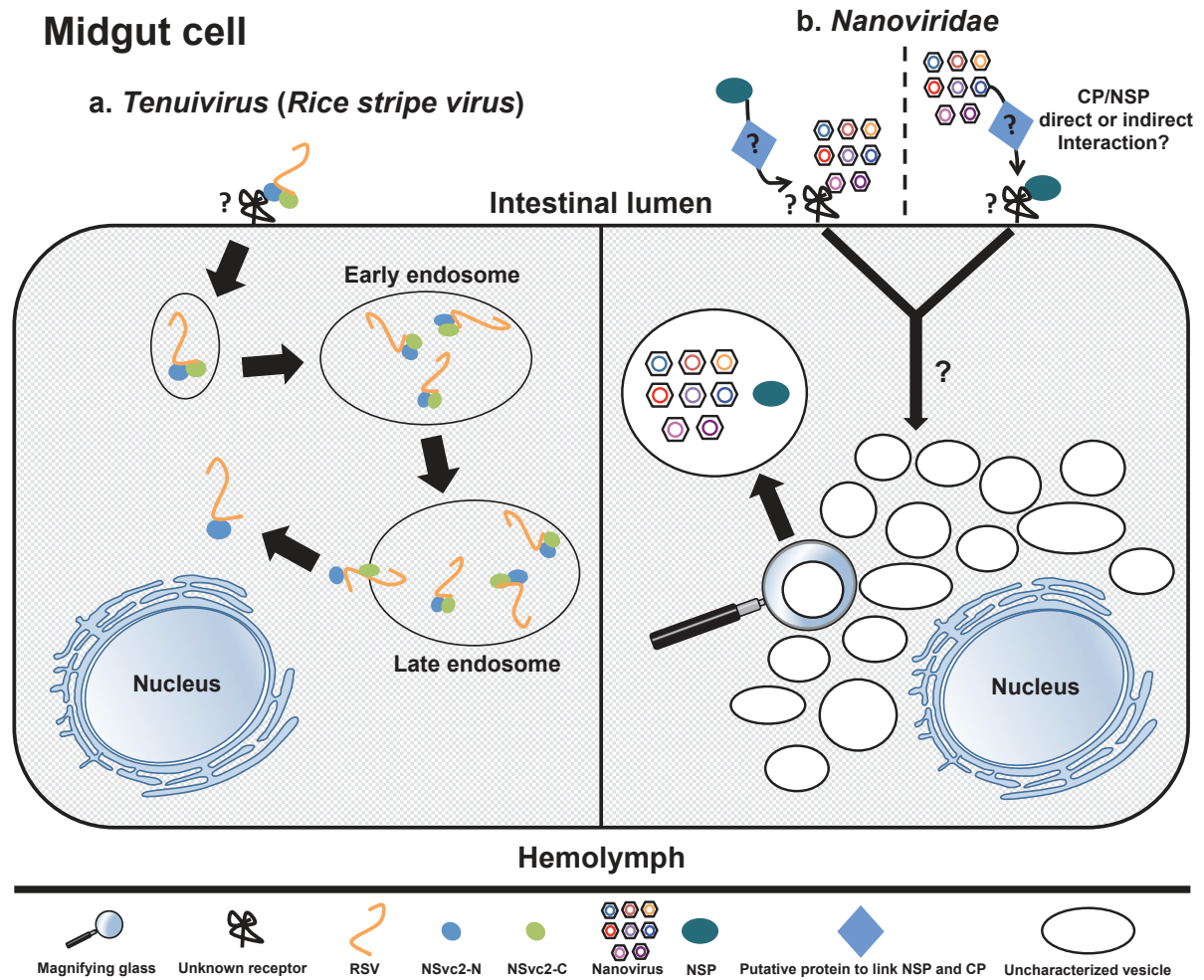


Figure 2: Schematization of the hypothetical mode of action of HC for circulative viruses transmitted by hemipteran insects

The mode of action of HC in circulative propagative transmission of tenuiviruses is summarized on the left. The mode of action of the HC of circulative non propagative nanoviruses is shown on the right. Tenuivirus part is adapted from (Lu *et al* 2019).

A thorough characterization of protein-protein interactions was conducted between the eight proteins of another nanovirus, *Pea necrotic yellow dwarf virus* (PNYDV), using bimolecular fluorescence complementation (BiFC; (Krenz *et al.* 2017). This approach revealed that NSP interacts with itself and with M-Rep (the replication-associated protein) but, surprisingly enough, not with the coat protein CP. Because an interaction between NSP and CP has since then been reported for babuviruses (Ji *et al.* 2019, Yu *et al.* 2019), this question definitely deserves further investigation for nanoviruses. In the BiFC system, the fusion of fluorescent reporter protein to NSP may have hindered the interaction with CP.

One highly consistent observation on the action of HCs in non-circulative transmission is that it must be acquired first, prior to the virus particles, the reverse acquisition sequence being non functional. This has always been interpreted as related to the capacity of the helper to recognize its receptor in the vector mouthparts or foregut, while the virus particle cannot directly do this and is thus “flushed” with the digestive flux/transit when acquired first and alone. Recent work from our laboratory yielded a contradicting observation (**Di Mattia et al 2021, in prep, Chaapitre 3**). As mentioned above, some genome segments of nanoviruses can be omitted at inoculation of host plants and we made use of this possibility to design sequential acquisition experiments. Plants infected with either segment N or segment U4 missing (respectively named FBNSV-N⁽⁻⁾ and FBNSV-U4⁽⁻⁾) exhibit symptoms similar to those resulting from wild type FBNSV infection, and FBNSV-U4⁽⁻⁾ is perfectly transmissible by aphid while FBNSV-N⁽⁻⁾ is not (**Grigoras et al. 2018**). According to the current understanding of the mode of action of HCs, aphids fed first on the FBNSV-U4⁽⁻⁾ plants should acquire NSP and subsequently complement the acquisition and transmission of the segment U4 from FBNSV-N⁽⁻⁾ plants. In contrast, in the reverse acquisition sequence, U4-containing virus particles should not be internalized in and transmitted by aphid, due to the absence of NSP protein in the first acquisition from FBNSV-N⁽⁻⁾ plants, and due to their absence in the second acquisition from FBNSV-U4⁽⁻⁾ plants. To our surprise, U4 segment was as efficiently internalized in and transmitted by aphids whatever the sequence of acquisition (**Di Mattia et al 2021**). This proved true even when aphids were “purged” on healthy plants up to 3 days in between the two acquisition phases. This observation is very intriguing, and is further discussed in the last section. It demonstrates that, in the case of nanoviruses, the HC can expectedly wait for virions within the aphid, but that the virions can somewhat unexpectedly wait for the HC for several days without being flushed out by the digestive flux.

d. Conclusion

- i) What is a helper component

When Froissart and colleagues (**Froissart et al. 2002**) proposed the extended definition of HC, the helper-dependent strategy was almost exclusively described for non-circulative viruses. Most knowledge on the nature and mode of action of HCs were based on the thorough characterization of the best-studied cases, P2 of CaMV and HC-Pro of potyviruses, but the proposed definition also accounted for the fragmentary data on HCs of other virus groups available at that time (Table 1). Since then, additional reports have been published, the most intriguing being those definitely confirming the existence of the helper strategy in circulative transmission (**Grigoras et al. 2018, Lu et al. 2019, Di Mattia et al 2021**). In all

cases, HCs are non-structural proteins encoded by the virus and they are mandatory for the success of vectors transmission. One key feature of HCs that is confronted by these recent findings is the sequential acquisition of HC and virions. While the sequential acquisition was always shown to be possible solely if the HC is acquired first, the study of a circulative nanovirus (**Di Mattia et al 2021**) proved that the reverse sequence also works in this viral system. At this stage, it is not clear whether this observation is inherent to a distinct mode of action of HCs in circulative viruses, because the only other HC characterized for another circulative virus, the phenuivirus RSV (**Lu et al. 2019**), has not been tested when acquired after the virus particles.

The sequential acquisition has been proposed as a key feature of HCs because it allows HC-trans-complementation, *e.i.* the HC encoded by an genome X in a virus population can assist the transmission of a genome Y from the same population or from another population in another host plant, allowing cooperation between related viral genomes at the transmission step rather than competition (**Pirone and Blanc 1996**). It is noticeable that, in this view, the sequence of acquisition does not matter, and so the current definition of HCs still perfectly holds for all cases reported thus far.

ii) How does a helper component works

The sole mode of action of HCs reported to date is the bridge hypothesis extensively described in previous sections. This hypothesis derives from the observation that HCs have to be present for the virus particle to be efficiently retained or internalized in the vector. Without HC, virions are supposedly flushed together with the flux in the digestive track, explaining why the HC have to be acquired either prior to or together with the virus particles. Clearly, the fact that the HC of nanoviruses (the NSP protein) can efficiently mediate the aphid transmission of virus particles acquired several days ahead is questioning its mode of action (**Di Mattia et al 2021**). The virus particle could somehow be retained within the gut lumen of aphid vectors and be internalized and accumulate within epithelial gut cells solely through the action of the protein NSP. This is opening several possibilities that are calling for further investigation. The virus particles could be retained in the gut lumen non-specifically, embedded in gut cell secretions or stuck in the microvilli, but they could also be specifically attached to membrane receptors. Investigating the viral determinant of nanovirus-aphid specificity would answer this question. Then the NSP protein acquired later could trigger endocytosis of virions or of NSP-virion complexes. Additional role of NSP in transcytosis, and release of virus particles into the hemolymph are also conceivable and would all represent a mode of action significantly distinct from the classical bridge hypothesis.

iii) Why are helper component so frequent

The distinction between capsid and helper strategies in vector-transmission of viruses has been conceptualized and empirically studied solely in plant virology. The requirement of an HC for successful virus-vector interaction have been confirmed countless times, on totally unrelated viruses, transmitted by unrelated vectors, through very different mechanisms (**Hogenhout et al. 2008, Dietzgen et al. 2016, Lu et al. 2019**). Therefore, the helper strategy certainly evolved several times independently, indicating that it likely confers a selective benefit, at least in some environmental conditions. Paradoxically, because it requires the production of an additional viral protein to ensure virus transmission, the helper strategy may incur a cost to the virus when compared to the capsid strategy. However, some HCs interact with various partners (other viral, host plant or vector molecules) at different steps of the virus cycle, either in the vector or within the host plant where they ensure important and diverse functions. A case study is the multi-tasking protein HC-Pro of potyvirids involved in many different processes (recently reviewed in (**Valli et al. 2018**)). This multifunctionality may compensate the cost associated to the maintenance of a helper protein, and may instead confer specific benefit to viruses. But, not all HCs are known to be multifunctional and so the benefit they may provide remains largely elusive. Their possible multifarious mode of action in distinct viral clades may stem from the fact that each of these clades have evolved HCs with their own molecular means, and thus the question of whether the selective pressure that drove this evolution are similar in all cases is an interesting issue. In other words, whether all HCs have been selected for the same reason, and for what reason, is a complete mystery for which some speculations are provided below.

Cooperation hypothesis

A long-standing proposition is that HCs could result from selection at the quasispecies/virus population level (**Pirone and Blanc 1996**). According to these authors, HC allows cooperation between genomes of a viral population (or of distinct populations located in different host plants) during vector transmission, whereas the capsid strategy does not. If a genome within a population produces a HC that is adapted to the dominant vector species in a given place and at a given time, it will assist the transmission of other genomes acquired through HC-Trans-complementation that do not produce such adapted HC. The consequence is the relaxing of the bottleneck associated to selection by the vector and maintenance of a higher polymorphisms in the transmitted populations. This hypothetical

benefit could apply to all virus species with the helper strategy, but unfortunately no experimental support has been provided, and a way to test for it is even hard to imagine.

Collective transmission hypothesis

An important proportion (that can be up to 100%) of virions from viral populations of most virus species appears to contain defective genomes (for reviews on defective particles see **(Sun and Brooke 2018, Vignuzzi and Lopez 2019)**, or only part of the genetic information (for a review on multipartite virus see **(Michalakis et Blanc 2020)**), resulting in a possible benefit of co-transmitting several particles to the same host (or cell within this host) in order to restore infectivity. This view of a viral infectious unit as a “collective infectious unit” has been reviewed countless times recently, and in particular the mechanisms through which viruses can achieve collective transmission (**Sanjuan 2017, Sanjuan 2018, Leeks, Sanjuan et al. 2019, Sanjuan and Thoulouze 2019, Shirogane et al. 2019**). While the mechanisms invoked include the incorporation of several genomes in the same capsid (bacteriophage), the passage of large amounts of virus particles through virus-induced nanotubes connecting distinct cells or through membrane vesicles transferring in viral synapses (HIV, Influenza, Herpesvirus), the formation of virion aggregates with spontaneous binding between particles (vesicular stomatitis virus), or the multi-virion complexes found in occlusion bodies of baculoviruses, HCs have not been hypothesized to potentially facilitate collective transmission. Most characterized HC have been demonstrated to bind the virus coat protein (**Blanc et al. 1997, Peng et al. 1998, Plisson et al. 2005, Hoh et al. 2010, Ji et al. 2019, Lu et al. 2019, Yu et al. 2019**) and to also self-interact (**Hébrard et al. 2001, Ruiz-Ferrer et al. 2005, Krenz et al. 2017**), and thus to possibly trigger aggregation of virus particles. For example, we have demonstrated that the genome segments of nanoviruses acquired simultaneously (**Di Mattia et al. 2020**) or even sequentially (**Di Mattia et al 2021**) by the aphid vector accumulate all together in the same intracellular aggregates in the AMG cells solely if a functional segment N encoding the NSP protein is present in infected plants. Nanoviruses being multipartite, collective transmission of several viral particles may appear immediately beneficial (**Michalakis et Blanc 2020**). However, HCs have been described in very numerous monopartite viruses, suggesting that, under this hypothesis, collective transmission would be beneficial whatever the genome architecture/organization.

The effector hypothesis

When entering a cell, viruses have to manipulate its defenses to initiate infection (**Wu et al. 2019**). This is true for many intracellular pathogens, including bacteria and fungi, which release effector proteins hampering cell-defense and facilitating infection. When injected into

a new plant by a vector, one viral protein that is first in contact with the host cell is the coat protein. While its putative contribution to counter cell defenses has been envisaged and discussed (**Conti et al. 2017, Nicaise and Candresse 2017, Wu et al. 2019**), that HCs could also be released together with virions and act as very early pathogen effectors has not. Most if not all HCs of non-circulative and circulative viruses could be multifunctional proteins. Beyond constituting a molecular bridge linking the virus particles to vector receptors, HCs also frequently have additional features that could reveal effector activity. The most famous example is the HC-Pro of potyviruses that can hinder the plant RNAi machinery, but other HCs, less understood, can also block the microtubular network (P2 of CaMV; (**Bak et al. 2013**)), induce membrane fusion (NSvc2C of RSV; (**Lu et al. 2019**)) or interact with stress granules (NSP of PNYDV, (**Krapp et al. 2017**)). That they interact with highly symmetrically arranged coat proteins, either icosahedral or helicoïdal, offers multiple attachment sites per particle and ensures that a high number of HCs can potentially be retained in and be released from the vector together with virions. The amount of HC molecules delivered could even be larger when HCs are prone to self-oligomerization as is the case for HC-Pro of potyviruses (**Ruiz-Ferrer et al. 2005**), P2 of CaMV (**Thornbury et al. 1985, Hébrard et al. 2001, Plisson et al. 2003**), NSP of nanoviruses (**Krenz et al. 2017**) and NSvc2 of RSV (**Lu et al. 2019**). Hence, mobilizing a limited number of receptors in the vector would allow hundreds of HC molecules to be retained and/or internalized and later inoculated into the plant. The present paradigm regarding the primary role of an HC could thus completely change by considering that it could be an effector useful to the virus upon arrival in a cell and that its binding to the virus particles and to the vector would merely ensure that it travels and is delivered with it. Whether HCs are released together with virions within host plant cells is not known but investigation of this question would be relevant for this hypothesis. It is also important to note that the “effector” hypothesis could apply to all HCs described thus far, and that the effector function may either act in host plant cells, in vector cells, or both.

In conclusion, several potential benefits associated to the helper strategy are imaginable. We insisted in this conclusion that each of this benefit could apply to all cases described, whatever that viral clade concerned. However, we cannot exclude that distinct helpers have evolved for distinct reasons and perhaps, other potential explanation are still to be conceived. Unfortunately, as they stand, the here-described hypothesis, with perhaps the exception of the “effector hypothesis” are not empirically testable, maintaining the question of the *raison-d'être* of HCs a major conceptual challenge for future research in plant virology.

Virus family	Virus genera	Virus species where HC was first discovered	Virus acronym	HC complete name	HC acronym	Transmission mode	Vector taxon	First HC Reference
<i>Potyviridae</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potato virus Y</i>	PVY	Helper component proteinase	HC-Pro	Noncirculative	Aphid	(Kassanis and Govier 1971a, Kassanis and Govier 1971b)
	<i>Tritimovirus</i>	<i>Sweetpotato mild mottle virus</i>	SPMMV				Whitefly	(Colinet et al. 1998)
	<i>Ipomovirus</i>	<i>Wheat streak mosaic virus</i>	WSMV				Mite	(Stenger et al. 2005)
<i>Caulimoviridae</i>	<i>Caulimovirus</i>	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	CaMV	Protein P2	P2		Aphid	(Lung and Pirone 1973)
<i>Virgaviridae</i>	<i>Tobravirus</i>	<i>Tobacco rattle virus</i>	TRV	Protein 2b	2b		Nematode	(MacFarlane et al. 1996)
<i>Phenuiviridae</i>	<i>Tenuivirus</i>	<i>Rice stripe virus</i>	RSV	Non-structural glycoprotein 2	NSvc2		Circulative propagative	Planthopper
<i>Nanoviridae</i>	<i>Babuvirus</i>	<i>Faba bean necrotic yellow virus</i>	FBNYV	Nuclear shuttle protein	NSP	Circulative nonpropagative	Aphid	(Franz et al. 1999)
	<i>Nanovirus</i>							

Table 1: Helper components in distinct plant virus families

3. References

- Allison, R. F., J. C. Sorenson, M. E. Kelly, F. B. Armstrong and W. G. Dougherty (1985). "Sequence determination of the capsid protein gene and flanking regions of tobacco etch virus: Evidence for synthesis and processing of a polyprotein in potyvirus genome expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(12): 3969-3972.
- Ammar, E. D. (1994). "Propagative transmission of plant and animal viruses by insects: factors affecting vector specificity and competence." *Adv Dis Vector Res* **10**: 289-331.
- Armour, S. L., U. Melcher, T. P. Pirone, D. J. Lyttle and R. C. Essenberg (1983). "Helper component for aphid transmission encoded by region II of cauliflower mosaic virus DNA." *Virology* **129**: 25-30.
- Atreya, C., B. Raccah and T. Pirone (1990). "A point mutation in the coat protein abolishes aphid transmissibility of a potyvirus." *Virology* **178**: 161-165.
- Atreya, C. D., P. L. Atreya, D. W. Thornbury and T. P. Pirone (1992). "Site-directed mutations in the potyvirus HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants." *Virology* **191**(1): 106-111.
- Atreya, C. D. and T. P. Pirone (1993). "Mutational analysis of the helper component-proteinase gene of a potyvirus: effects of amino acid substitutions, deletions, and gene replacement on virulence and aphid transmissibility." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(24): 11919-11923.
- Atreya, P. L., J. J. Lopez-Moya, M. Chu, C. D. Atreya and T. P. Pirone (1995). "Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids." *J Gen Virol* **76 (Pt 2)**: 265-270.
- Bak, A., D. Gargani, J. L. Macia, E. Malouvet, M. S. Vernerey, S. Blanc and M. Drucker (2013). "Virus factories of cauliflower mosaic virus are virion reservoirs that engage actively in vector transmission." *J Virol* **87**(22): 12207-12215.
- Berger, P. H. and T. P. Pirone (1986). "The effect of helper-component on the uptake and localization of Potyviruses in *Myzus persicae*." *Virology* **153**: 256-261.
- Berthelot, E., M. Ducouso, J. L. Macia, F. Bogaert, V. Baecker, G. Thebaud, R. Gallet, M. Yvon, S. Blanc, M. Khelifa and M. Drucker (2019). "Turnip Mosaic Virus Is a Second Example of a Virus Using Transmission Activation for Plant-to-Plant Propagation by Aphids." *J Virol* **93**(9).
- Berthelot, E., J. L. Macia, A. Martiniere, A. Morisset, R. Gallet, S. Blanc, M. Khelifa and M. Drucker (2019). "Pharmacological analysis of transmission activation of two aphid-vectored plant viruses, turnip mosaic virus and cauliflower mosaic virus." *Sci Rep* **9**(1): 9374.
- Blanc, S. (2008). Vector transmission of plant viruses. *Encyclopedia of Virology*. B. W. J. Mahy and M. H. V. van Regenmortel, Elsevier Ltd.: 274-282.
- Blanc, S., D. E. Ammar, S. Garcia-Lampasona, V. V. Dolja, C. Llave, J. Baker and T. P. Pirone (1998). "Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets." *Journal of General Virology* **79**(12): 3119-3122.
- Blanc, S., M. Cerutti, H. Chaabihi, C. Louis, G. Devauchelle and R. Hull (1993). "Gene II product of an aphid-nontransmissible isolate of cauliflower mosaic virus expressed in a baculovirus system possesses aphid transmission factor activity." *Virology* **192**: 651-654.
- Blanc, S., M. Cerutti, M. Usmany, J. M. Vlak and R. Hull (1993). "Biological activity of cauliflower mosaic virus aphid transmission factor expressed in a heterologous system." *Virology* **192**: 643-650.
- Blanc, S., M. Drucker and M. Uzeš (2014). "Localizing viruses in their insect vectors." *Annu Rev Phytopathol* **52**: 403-425.

- Blanc, S. and S. Gutierrez (2015). "The specifics of vector transmission of arboviruses of vertebrates and plants." *Curr Opin Virol* **15**: 27-33.
- Blanc, S., J. J. Lopez-Moya, R. Wang, S. Garcia-Lampasona, D. W. Thornbury and T. P. Pirone (1997). "A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus." *Virology* **231**(1): 141-147.
- Bradley, R. H. and R. Y. Ganong (1955). "Evidence that potato virus Y is carried near the tip of the stylets of the aphid vector *Myzus persicae* (sulz.)." *Can J Microbiol* **1**(9): 775-782.
- Bradley, R. H. and R. Y. Ganong (1955). "Some effects of formaldehyde on potato virus Y in vitro, and ability of aphids to transmit the virus when their stylets are treated with formaldehyde." *Can J Microbiol* **1**(9): 783-793.
- Bressan, A. and S. Watanabe (2011). "Immunofluorescence localisation of Banana bunchy top virus (family Nanoviridae) within the aphid vector, *Pentalonia nigronervosa*, suggests a virus tropism distinct from aphid-transmitted luteoviruses." *Virus Res* **155**(2): 520-525.
- Canto, T., J. J. Lopez-Moya, M. T. Serra-Yoldi, J. R. Diaz-Ruiz and D. Lopez-Abella (1995). "Different helper component mutations associated with lack of aphid transmissibility in two isolates of potato virus Y." *Phytopathology* **85**: 1519-1525.
- Carrington, J. C., S. M. Cary, T. D. Parks and W. G. Dougherty (1989). "A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome." *Embo J* **8**(2): 365-370.
- Carrington, J. C., D. D. Freed and T. C. Sanders (1989). "Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and in vitro." *J Virol* **63**(10): 4459-4463.
- Chen, Y., M. Dessau, D. Rotenberg, D. A. Rasmussen and A. E. Whitfield (2019). "Entry of bunyaviruses into plants and vectors." *Adv Virus Res* **104**: 65-96.
- Colinet, D., J. Kummert and P. Lepoivre (1998). "The nucleotide sequence and genome organization of the whitefly transmitted sweetpotato mild mottle virus: a close relationship with members of the family Potyviridae." *Virus Res* **53**(2): 187-196.
- Conti, G., M. C. Rodriguez, A. L. Venturuzzi and S. Asurmendi (2017). "Modulation of host plant immunity by Tobamovirus proteins." *Annals of Botany* **119**(5): 737-747.
- Daubert, S., R. J. Shepherd and R. C. Gardner (1983). "Insertional mutagenesis of the cauliflower mosaic virus genome." *Gene* **25**(2-3): 201-208.
- Deshoux, M., V. Masson, K. Arafah, S. Voisin, N. Guschinskaya, M. van Munster, B. Cayrol, C. G. Webster, Y. Rahbe, S. Blanc, P. Bulet and M. Uzest (2020). "Cuticular Structure Proteomics in the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum* Reveals New Plant Virus Receptor Candidates at the Tip of Maxillary Stylets." *J Proteome Res* **19**(3): 1319-1337.
- Di Mattia, J., M. S. Vernerey, M. Yvon, E. Piroles, M. Villegas, Y. Gaafar, H. Ziebell, Y. Michalakis, J. L. Zeddani and S. Blanc (2020). "Route of a Multipartite Nanovirus across the Body of Its Aphid Vector." *J Virol* **94**(9).
- Dietzgen, R. G., K. S. Mann and K. N. Johnson (2016). "Plant Virus-Insect Vector Interactions: Current and Potential Future Research Directions." *Viruses* **8**(11).
- Dombrovsky, A., N. Gollop, S. Chen, N. Chejanovsky and B. Raccah (2007). "In vitro association between the helper component-proteinase of zucchini yellow mosaic virus and cuticle proteins of *Myzus persicae*." *J Gen Virol* **88**(Pt 5): 1602-1610.
- Domier, L. L., K. M. Franklin, M. Shahabuddin, G. M. Hellmann, J. H. Overmeyer, S. T. Hiremath, M. F. Siaw, G. P. Lomonosoff, J. G. Shaw and R. E. Rhoads (1986). "The nucleotide sequence of tobacco vein mottling virus RNA." *Nucleic Acids Res* **14**(13): 5417-5430.
- Dougherty, W. G. and J. C. Carrington (1988). "Expression and function of potyviral gene products." *Annual Review of Phytopathology* **26**: 123-143.

Drucker, M., R. Froissart, E. Hebrard, M. Uzest, M. Ravallec, P. Esperandieu, J. C. Mani, M. Pugniere, F. Roquet, A. Fereres and S. Blanc (2002). "Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 2422-2427.

Drucker, M. and C. Then (2015). "Transmission activation in non-circulative virus transmission: a general concept?" *Curr Opin Virol* **15**: 63-68.

Espinoza, A. M., M. Usmany, T. P. Pirone, M. Harvey, C. J. Woolston, V. Medina, J. M. Vlak and R. Hull (1992). "Expression of cauliflower mosaic virus ORF II in a baculovirus system." *Intervirology* **34**(1): 1-12.

Fernandez-Calvino, L., E. Goytia, D. Lopez-Abella, A. Giner, M. Urizarna, L. Vilaplana and J. J. Lopez-Moya (2010). "The helper-component protease transmission factor of tobacco etch potyvirus binds specifically to an aphid ribosomal protein homologous to the laminin receptor precursor." *J Gen Virol* **91**(Pt 11): 2862-2873.

Franz, A. W., F. van der Wilk, M. Verbeek, A. M. Dullemans and J. F. van den Heuvel (1999). "Faba bean necrotic yellows virus (genus Nanovirus) requires a helper factor for its aphid transmission." *Virology* **262**(1): 210-219.

Froissart, R., Y. Michalakakis and S. Blanc (2002). "Helper component-transcomplementation in the vector transmission of plant viruses." *Phytopathology* **92**(6): 576-579.

Gal-On, A., Y. Antignus, A. Rosner and B. Raccach (1992). "A mutation in the coat protein gene of zucchini yellow mosaic virus restored its aphid transmissibility but had no effect on its multiplication." *J Gen Virol* **73**: 2183-2187.

Govier, D. A. and B. Kassanis (1974). "Evidence that a component other than the virus particle is needed for aphid transmission of potato virus Y." *Virology* **57**(1): 285-286.

Govier, D. A. and B. Kassanis (1974). "A virus induced component of plant sap needed when aphids acquire potato virus Y from purified preparations." *Virology* **61**: 420-426.

Govier, D. A., B. Kassanis and T. P. Pirone (1977). "Partial purification and characterization of the potato virus Y helper component." *Virology* **61**: 420-426.

Granier, F., M. Durand-Tardif, F. Casse-Delbart, H. Lecoq and C. Robaglia (1993). "Mutations in zucchini yellow mosaic virus helper component protein associated with loss of aphid transmissibility." *J Gen Virol* **74**(Pt 12): 2737-2742.

Grigoras, I., A. I. d. C. Ginzo, D. P. Martin, A. Varsani, J. Romero, A. C. Mammadov, I. M. Huseynova, J. A. Aliyev, A. Kheyr-Pour, H. Huss, H. Ziebell, T. Timchenko, H.-J. Vetten and B. Gronenborn (2014). "Genome diversity and evidence of recombination and reassortment in nanoviruses from Europe." *The Journal of general virology* **95**(Pt 5): 1178-1191.

Grigoras, I., T. Timchenko, L. Katul, A. Grande-Perez, H. J. Vetten and B. Gronenborn (2009). "Reconstitution of authentic nanovirus from multiple cloned DNAs." *J Virol* **83**(20): 10778-10787.

Grigoras, I., H. J. Vetten, U. Commandeur, H. Ziebell, B. Gronenborn and T. Timchenko (2018). "Nanovirus DNA-N encodes a protein mandatory for aphid transmission." *Virology* **522**: 281-291.

Gronenborn, B. (2004). "Nanoviruses: genome organisation and protein function." *Vet Microbiol* **98**(2): 103-109.

Guardado-Calvo, P. and F. A. Rey (2017). "The Envelope Proteins of the Bunyavirales." *Adv Virus Res* **98**: 83-118.

Harrison, B. D. and D. J. Robinson (1988). "Molecular variation in vector-borne plant viruses: epidemiological significance." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **321**(1207): 447-462.

Hébrard, E., M. Drucker, D. Leclerc, T. Hohn, M. Uzest, R. Froissart, J.-M. Strub, S. Sanglier, A. van Dorsselaer, A. Padilla, G. Labesse and S. Blanc (2001). "Biochemical

Characterization of the Helper Component of Cauliflower Mosaic Virus." *J. Virol.* **75**(18): 8538-8546.

Hepojoki, J., T. Strandin, A. Vaheri and H. Lankinen (2010). "Interactions and Oligomerization of Hantavirus Glycoproteins." *J Virol* **84**(1): 227-242.

Hogenhout, S. A., D. Ammar el, A. E. Whitfield and M. G. Redinbaugh (2008). "Insect vector interactions with persistently transmitted viruses." *Annu Rev Phytopathol* **46**: 327-359.

Hoh, F., M. Uzest, M. Drucker, C. Plisson-Chastang, P. Bron, S. Blanc and C. Dumas (2010). "Structural insights into the molecular mechanisms of cauliflower mosaic virus transmission by its insect vector." *J Virol* **84**(9): 4706-4713.

Howarth, A. J., R. C. Gardner, J. Messing and R. J. Shepherd (1981). "Nucleotide sequence of naturally occurring deletion mutants of cauliflower mosaic virus." *Virology* **112**: 678-685.

Howell, S. H. and R. Hull (1978). "Replication of cauliflower mosaic virus and transcription of its genome in turnip leaf protoplasts." *Virology* **86**(2): 468-481.

Huet, H., A. Gal-On, E. Meir, H. Lecoq and B. Raccah (1994). "Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility." *J Gen Virol* **75**(Pt 6): 1407-1414.

Ji, X. L., N. T. Yu, L. Qu, B. B. Li and Z. X. Liu (2019). "Banana bunchy top virus (BBTV) nuclear shuttle protein interacts and re-distributes BBTV coat protein in *Nicotiana benthamiana*." *3 Biotech* **9**(4): 121.

Kamangar, B., O. Christiaens, N. T. Taning, K. De Jonghe and G. Smaghe (2019). "The cuticle protein MPCP2 is involved in Potato virus Y transmission in the green peach aphid *Myzus persicae*." *Journal of Plant Diseases and Protection* **126**: 351-357.

Kassanis, B. and D. A. Govier (1971a). "The role of the helper virus in aphid transmission of potato aucuba mosaic virus and potato virus C." *J. Gen. Virol.* **13**: 221-228.

Kassanis, B. and D. A. Govier (1971b). "New evidence on the mechanism of transmission of potato C and potato aucuba mosaic viruses." *J. Gen. Virol.* **10**: 99-101.

Krapp, S., E. Greiner, B. Amin, U. Sonnewald and B. Krenz (2017). "The stress granule component G3BP is a novel interaction partner for the nuclear shuttle proteins of the nanovirus pea necrotic yellow dwarf virus and geminivirus abutilon mosaic virus." *Virus research* **227**: 6-14.

Krenz, B., I. SchieSSL, E. Greiner and S. Krapp (2017). "Analyses of pea necrotic yellow dwarf virus-encoded proteins." *Virus genes* **53**(3): 454-463.

Leeks, A., R. Sanjuan and S. A. West (2019). "The evolution of collective infectious units in viruses." *Virus Res* **265**: 94-101.

Leh, V., E. Jacquot, A. Geldreich, M. Haas, S. Blanc, M. Keller and P. Yot (2001). "Interaction between the open reading frame III product and the coat protein is required for transmission of cauliflower mosaic virus by aphids." *J Virol* **75**(1): 100-106.

Leh, V., E. Jacquot, A. Geldreich, T. Hermann, D. Leclerc, M. Cerutti, P. Yot, M. Keller and S. Blanc (1999). "Aphid transmission of cauliflower mosaic virus requires the viral PIII protein." *Embo J* **18**(24): 7077-7085.

Lu, G., S. Li, C. Zhou, X. Qian, Q. Xiang, T. Yang, J. Wu, X. Zhou, Y. Zhou, X. S. Ding and X. Tao (2019). "Tenuivirus utilizes its glycoprotein as a helper component to overcome insect midgut barriers for its circulative and propagative transmission." *PLoS Pathog* **15**(3): e1007655.

Lung, M. C. Y. and T. P. Pirone (1973). "Studies on the reason for differential transmissibility of cauliflower mosaic virus isolates by aphids." *Phytopathology* **63**: 910-914.

Lung, M. C. Y. and T. P. Pirone (1974). "Acquisition factor required for aphid transmission of purified cauliflower mosaic virus." *Virology* **60**: 260-264.

MacFarlane, S. A., N. Vassilakos and D. J. Brown (1999). "Similarities in the genome organization of tobacco rattle virus and pea early-browning virus isolates that are transmitted by the same vector nematode." *J Gen Virol* **80** (Pt 1): 273-276.

MacFarlane, S. A., C. V. Wallis and D. J. Brown (1996). "Multiple virus genes involved in the nematode transmission of pea early browning virus." *Virology* **219**(2): 417-422.

Martiniere, A., A. Bak, J. L. Macia, N. Lautredou, D. Gargani, J. Doumayrou, E. Garzo, A. Moreno, A. Fereres, S. Blanc and M. Drucker (2013). "A virus responds instantly to the presence of the vector on the host and forms transmission morphs." *Elife* **2**: e00183.

Martinière, A., D. Gargani, M. Uzest, N. Lautredou, S. Blanc and M. Drucker (2009). "A Role for Plant Microtubules in the Formation of Transmission-specific inclusion bodies of Cauliflower mosaic virus." *Plant J* **58**: 135-146.

Moreno, A., E. Hebrard, M. Uzest, S. Blanc and A. Fereres (2005). "A single amino acid position in the helper component of cauliflower mosaic virus can change the spectrum of transmitting vector species." *J Virol* **79**(21): 13587-13593.

Nault, L. R. (1997). "Arthropod transmission of plant viruses : a new synthesis." *Ann. Entomol. Soc. Am.* **90**: 521-541.

Ng, J. C. and K. L. Perry (2004). "Transmission of plant viruses by aphid vectors." *Mol Plant Pathol* **5**(5): 505-511.

Nicaise, V. and T. Candresse (2017). "Plum pox virus capsid protein suppresses plant pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity." *Mol plant pathol* **18**(6): 878-886.

Peng, Y. H., D. Kadoury, A. Gal-On, H. Huet, Y. Wang and B. Raccach (1998). "Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions." *J Gen Virol* **79** (Pt 4): 897-904.

Pirone, T. P. (1964). "Aphid transmission of a purified stylet-borne virus acquired through membrane." *Virology* **23**: 107-108.

Pirone, T. P. and S. Blanc (1996). "Helper-dependent vector transmission of plant viruses." *Annu Rev Phytopathol* **34**: 227-247.

Pirone, T. P. and E. S. Megahed (1966). "Aphid transmissibility of some purified viruses and viral RNAs." *Virology* **30**: 631-637.

Plisson, C., M. Drucker, S. Blanc, S. German-Retana, O. Le Gall, D. Thomas and P. Bron (2003). "Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein." *J Biol Chem* **278**(26): 23753-23761.

Plisson, C., M. Uzest, M. Drucker, R. Froissart, C. Dumas, J. Conway, D. Thomas, S. Blanc and P. Bron (2005). "Structure of the mature P3-virus particle complex of cauliflower mosaic virus revealed by cryo-electron microscopy." *J Mol Biol* **346**(1): 267-277.

Powell, G. (2005). "Intracellular salivation is the aphid activity associated with inoculation of non-persistently transmitted viruses." *J Gen Virol* **86**(Pt 2): 469-472.

Ruiz-Ferrer, V., J. Boskovic, C. Alfonso, G. Rivas, O. Llorca, D. Lopez-Abella and J. J. Lopez-Moya (2005). "Structural analysis of tobacco etch potyvirus HC-pro oligomers involved in aphid transmission." *J Virol* **79**(6): 3758-3765.

Sanjuan, R. (2017). "Collective Infectious Units in Viruses." *Trends Microbiol* **25**(5): 402-412.

Sanjuan, R. (2018). "Collective properties of viral infectivity." *Curr Opin Virol* **33**: 1-6.

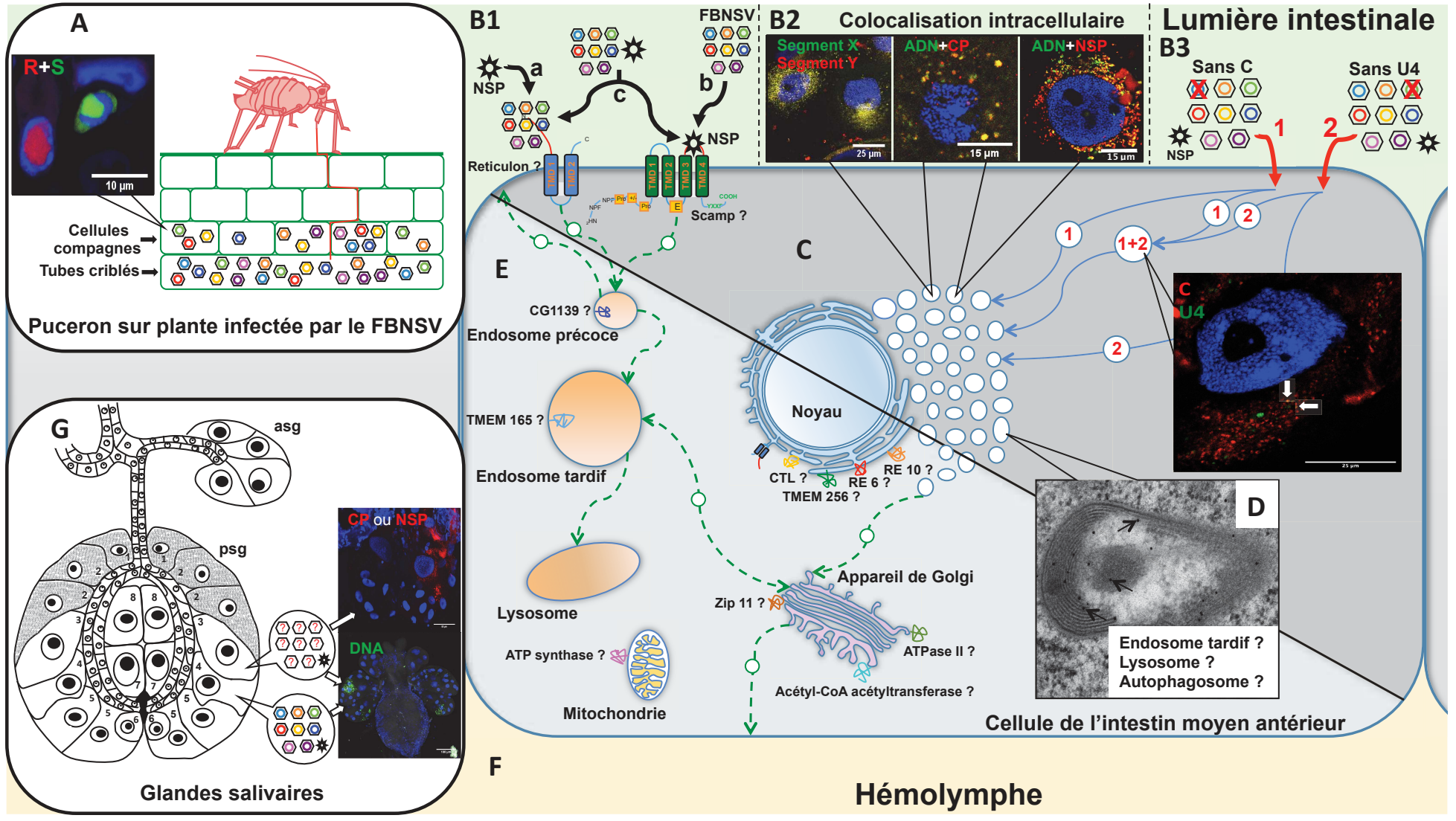
Sanjuan, R. and M. Thoulouze (2019). "Why viruses sometimes disperse in groups." *Virus evolution* **5**(1).

Schmidt, I., S. Blanc, P. Esperandieu, G. Kuhl, G. Devauchelle, C. Louis and M. Cerutti (1994). "Interaction between the aphid transmission factor and virus particles is a part of the molecular mechanism of cauliflower mosaic virus aphid transmission." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(19): 8885-8889.

- Shirogane, Y., S. Watanabe and Y. Yanagi (2019). "Cooperation between different variants: A unique potential for virus evolution." *Virus Res* **264**: 68-73.
- Shukla, D. D. and C. W. Ward (1989). "Structure of potyvirus coat proteins and its application in the taxonomy of the potyvirus group." *Adv Virus Res* **36**: 273-314.
- Stavolone, L., M. E. Villani, D. Leclerc and T. Hohn (2005). "A coiled-coil interaction mediates cauliflower mosaic virus cell-to-cell movement." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(17): 6219-6224.
- Stenger, D. C., G. L. Hein and R. French (2006). "Nested deletion analysis of Wheat streak mosaic virus HC-Pro: Mapping of domains affecting polyprotein processing and eriophyid mite transmission." *Virology* **350**(2): 465-474.
- Stenger, D. C., G. L. Hein, F. E. Gildow, K. M. Horken and R. French (2005). "Plant virus HC-Pro is a determinant of eriophyid mite transmission." *J Virol* **79**(14): 9054-9061.
- Sun, J. and C. B. Brooke (2018). "Influenza A Virus Superinfection Potential Is Regulated by Viral Genomic Heterogeneity." *mBio* **9**(5).
- Syller, J. (2006). "The roles and mechanisms of helper component proteins encoded by potyvirus and caulimoviruses." *Physiological and Molecular Plant Pathology* **67**: 119-130.
- Thornbury, D. W., G. M. Hellmann, R. E. Rhoads and T. P. Pirone (1985). "Purification and characterization of potyvirus helper component." *Virology* **144**(1): 260-267.
- Thornbury, D. W., C. A. Patterson, J. T. Dessens and T. P. Pirone (1990). "Comparative sequence of the helper component (HC) region of potato virus Y and a HC-defective strain, potato virus C." *Virology* **178**(2): 573-578.
- Thornbury, D. W. and T. P. Pirone (1983). "Helper components of two potyviruses are serologically distinct." *Virology* **125**: 487-490.
- Timchenko, T., L. Katul, M. Aronson, J. C. Vega-Arreguin, B. C. Ramirez, H. J. Vetten and B. Gronenborn (2006). "Infectivity of nanovirus DNAs: induction of disease by cloned genome components of Faba bean necrotic yellows virus." *J Gen Virol* **87**(Pt 6): 1735-1743.
- Toriyama, S. (1986). "Rice stripe virus: prototype of a new group of viruses that replicate in plants and insects." *Microbiol Sci* **3**(11): 347-351.
- Uzest, M., D. Gargani, A. Dombrovsky, C. Cazevieuille, D. Cot and S. Blanc (2010). "The "acrostyle": a newly described anatomical structure in aphid stylets." *Arthropod Struct Dev* **39**(4): 221-229.
- Uzest, M., D. Gargani, M. Drucker, E. Hebrard, E. Garzo, T. Candresse, A. Fereres and S. Blanc (2007). "A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(46): 17959-17964.
- Valli, A. A., A. Gallo, B. Rodamilans, J. J. Lopez-Moya and J. A. Garcia (2018). "The HCPro from the Potyviridae family: an enviable multitasking Helper Component that every virus would like to have." *Mol Plant Pathol* **19**(3): 744-763.
- Vassilakos, N., E. K. Vellios, E. C. Brown, D. J. Brown and S. A. MacFarlane (2001). "Tobravirus 2b protein acts in trans to facilitate transmission by nematodes." *Virology* **279**(2): 478-487.
- Vignuzzi, M. and C. Lopez (2019). "Defective viral genomes are key drivers of the virus–host interaction." *Nature Microbiology* **4**(7): 1075-1087.
- Wang, R. Y., E. D. Ammuar, D. W. Thornbury, J. J. Lopez-Moya and T. P. Pirone (1996). "Loss of potyvirus transmissibility and helper-component activity correlate with non-retention of virions in aphid stylets." *J Gen Virol* **77**(Pt 5): 861-867.
- Wang, R. Y., G. Powell, J. Hardie and T. P. Pirone (1998). "Role of the helper component in vector-specific transmission of potyviruses." *J Gen Virol* **79**(Pt 6): 1519-1524.
- Watanabe, S. and A. Bressan (2013). "Tropism, compartmentalization and retention of banana bunchy top virus (Nanoviridae) in the aphid vector *Pentalonia nigronervosa*." *J Gen Virol* **94**(Pt 1): 209-219.

- Webster, C. G., E. Pichon, M. van Munster, B. Monsion, M. Deshoux, D. Gargani, F. Calevro, J. Jimenez, A. Moreno, B. Krenz, J. R. Thompson, K. L. Perry, A. Fereres, S. Blanc and M. Uzest (2018). "Identification of Plant Virus Receptor Candidates in the Stylets of Their Aphid Vectors." *J Virol* **92**(14).
- Webster, C. G., M. Thillier, E. Pirolles, B. Cayrol, S. Blanc and M. Uzest (2017). "Proteomic composition of the acrostyle: Novel approaches to identify cuticular proteins involved in virus-insect interactions." *Insect Sci* **24**(6): 990-1002.
- Woolston, C. J., S. N. Covey, J. R. Penswick and J. W. Davies (1983). "Aphid transmission and a polypeptide are specified by a defined region of the cauliflower mosaic virus genome." *Gene* **23**: 15-23.
- Woolston, C. J., L. G. Czuplewski, P. G. Markham, A. S. Goad, R. Hull and J. W. Davies (1987). "Location and sequence of a region of Cauliflower Mosaic virus gene II responsible for Aphid transmissibility." *Virology* **160**: 246-251.
- Wu, X., A. Valli, J. A. Garcia, X. Zhou and X. Cheng (2019). "The Tug-of-War between Plants and Viruses: Great Progress and Many Remaining Questions." *Viruses* **11**(3): 203.
- Yao, M., X. Liu, S. Li, Y. Xu, Y. Zhou, X. Zhou and X. Tao (2014). "Rice stripe tenuivirus NSvc2 glycoproteins targeted to the golgi body by the N-terminal transmembrane domain and adjacent cytosolic 24 amino acids via the COP I- and COP II-dependent secretion pathway." *J Virol* **88**(6): 3223-3234.
- Young, B. A., G. L. Hein, R. French and D. C. Stenger (2007). "Substitution of conserved cysteine residues in wheat streak mosaic virus HC-Pro abolishes virus transmission by the wheat curl mite." *Arch Virol* **152**(11): 2107-2111.
- Yu N, W. J., Yu N, Zheng X, Zhou Q, Liu Z (2019). "Bioinformatics analysis of the interaction between coat protein and nuclear shuttle protein in babuvirus." *Am J plant Sci* **10**: 622-630.

Conclusion générale : Schémas bilan de l'interaction entre le FBNSV et les pucerons vecteurs



Puceron *Acyrthosiphon pisum*



--> Trajet subcellulaire hypothétique du FBNSV

○ Vésicules cytoplasmiques renfermant le FBNSV



Particules virales contenant chacune un des segments du FBNSV

→ Trajet subcellulaire du FBNSV lors d'acquisition séquentielle de deux lots de segments

Figure 1. Schéma bilan de mes travaux sur l'interaction entre le FBNSV et ses insectes vecteurs.

Chacun des 5 chapitres de ma thèse inclut ses propres conclusions et perspectives. Pour limiter les redondances, la conclusion générale est donc présentée sur la base d'un schéma bilan couplé à un résumé des résultats et conclusions les plus importants que j'ai pu obtenir sur l'interaction entre le FBNSV et ses pucerons vecteurs.

A. Un puceron (*Acyrtosiphon pisum* clone 210) se nourrit sur l'une de ses plantes hôtes infectées par le FBNSV. Dans les plantes, le virus est localisé dans les tubes criblés et les cellules compagnes (**Sicard et al. 2019**). Les segments d'ADN viral sont visualisables par microscopie confocale en utilisant des sondes spécifiques marquées soit en rouge soit en vert. La photo illustre le fait que chaque segment s'accumule indépendamment dans les cellules végétales, à l'exemple des segments R et S (**Sicard et al. 2019**). Ce résultat, obtenu par une étudiante en thèse avant mon arrivée, met en lumière la capacité du FBNSV à infecter une plante sans que toute son information génétique se retrouve dans les mêmes cellules, et illustre la possibilité d'un mode de vie multicellulaire pour ces virus (**Sicard et al. 2019**). Lorsqu'un puceron arrive sur une plante infectée, il perce la paroi cellulaire avec ses stylets et les insère jusqu'au phloème pour se nourrir dans les tubes criblés où l'ensemble des segments circulent (**Sicard et al. 2019**). Les particules sont ingérées et parviennent au niveau de l'intestin moyen antérieur (AMG) ; C'est là que débute la contribution issue de mon travail de thèse.

B. B1. Les différents composants du FBNSV essentiels à la transmission de ce virus (particules virales constituées de la CP et de l'ADN ainsi que le facteur assistant à la transmission, la protéine NSP (cf. chapitre 1)), peuvent être transmis selon les séquences d'acquisition schématisées sur la figure (B1a, b et c). Selon la séquence d'acquisition des particules virales et de la protéine NSP (cf. Chapitre3), différentes hypothèses peuvent être émises. En prenant en compte les résultats obtenus grâce au système de double hybride en levure (cf. chapitre 4), j'émetts l'hypothèse que le FBNSV posséderait deux récepteurs au niveau des cellules de l'AMG. Ces récepteurs fixeraient spécifiquement d'une part la protéine NSP (Scamp - **Hubbard et al. 2000; Law, Chow, et Jiang 2012**) et de l'autre les particules virales par l'intermédiaire de la CP (Reticulon - **Wakana et al. 2005**). Alternativement, un seul récepteur commun pourrait interagir avec les deux protéines (CP et NSP), ou avec une seule des deux protéines (**Grove et Marsh 2011**). B1a. Mise en évidence d'un nouveau mode d'action pour un facteur assistant de la transmission: possibilité de transmettre le FBNSV lorsque le facteur assistant est acquis après les particules virales (cf. chapitre 3 et 5). Dans ce cas de figure, on ignore où sont localisées les

particules virales en attente de la protéine NSP. Le plus probable est une localisation à la surface des cellules de l'AMG, dans la lumière intestinale, sur un récepteur spécifique aux particules virales ou commun aux particules virales et à la protéine NSP (cf. chapitre 4). B1b. Le schéma correspond à un fonctionnement plus classique des facteurs assistants de la transmission. La protéine NSP est acquise avant le virus et permet la transmission des particules virales acquises ensuite (cf. chapitre 3 et 5). Une façon de réconcilier B1a et B1b serait d'imaginer que NSP et la particule virale ont chacune leur récepteur qui fonctionnerait comme un « co-récepteur » qui n'entraînerait l'internalisation que quand les deux sont fixées. B1c. Acquisition simultanée des deux composants viraux essentiels à la transmission (cf. Chapitre 1 à 4). Chacun des composants viraux acquis peut interagir avec son récepteur ou un récepteur commun pour permettre l'internalisation du virus. B2. Les 8 segments du FBNSV s'accumulent ensemble au sein des cellules de l'AMG (cf. chapitre 1 et 3). L'ADN viral et les protéines CP et NSP co-localisent également ce qui démontre que les différents composants viraux s'accumulent tous ensemble dans les mêmes agrégats cytoplasmiques, peut être sous forme d'un complexe particule virale-NSP. B3. L'étude des acquisitions séquentielles de deux lots incomplets de segments du FBNSV comportant chacun sa propre protéine NSP a permis de mettre en lumière plusieurs mécanismes liés à l'accumulation du virus dans les cellules intestinales (cf. chapitre 3). Les marquages des ADN C et U4 ont mis en évidence que des lots de segments acquis séquentiellement peuvent se rejoindre dans les mêmes agrégats cytoplasmiques des cellules de l'AMG des pucerons. Cela indique que le 1^{er} lot de segments acquis se retrouve dans des structures pérennes qui pourront être alimentées durant plusieurs jours en particules virales nouvellement acquises. C. L'ensemble des résultats présentés dans cette partie de la cellule a été expérimentalement confirmé. Seule l'identité des récepteurs (Scamp et Reticulon) est hypothétique. D. Visualisation au microscope électronique des agrégats/structures marqués par des anticorps anti-CP du FBNSV couplés à des billes d'or (cf. Chapitre 1 et flèches noires dans le schéma bilan). Ces structures vésiculaires où le FBNSV s'accumule (cf. chapitres 1 et 3) possèdent une membrane formée de plusieurs couches. Cet empilement de couches membranaires laisse penser que ces vésicules pourraient être des endosomes tardifs, lysosomes ou autophagosomes (cf. chapitre 1 -(Zila *et al.* 2014) mais cela reste à confirmer.

L'organisation génomique des virus multipartites pose le défi du maintien de l'intégrité de ce génome d'autant plus que notre équipe a montré que les 8 segments du FBNSV (i) ne s'accumulent pas à la même fréquence dans la plante infectée (Sicard *et al.* 2013, 2015), et (ii) ne se retrouvent pas systématiquement tous ensemble dans les cellules végétales infectées (mode de vie multicellulaire – Sicard *et al.* 2019). Ces résultats, qui illustrent un mode de vie « atypique » des nanovirus, soulignent le risque de perte de segments lors du

passage à un nouvel hôte. Ce risque est accru par le fait que certains segments apparaissent non indispensables pour l'infection systémique des plantes dans les conditions de laboratoire (**Grigoras et al. 2018**, cf. chapitre 1 et 3). L'ensemble des résultats résumé en B1, B2 et en particulier B3 montre un rôle potentiellement important des mécanismes de la transmission par vecteur dans le maintien de l'intégrité du génome des nanovirus.

E. Cette partie du schéma de la cellule présente les hypothèses concernant le trajet subcellulaire du FBNSV en se basant, entre autre, sur les résultats obtenus en double hybride (cf. chapitre 4). Par manque de place sur le schéma bilan, certains candidats sont indiqués par leur seul acronyme : CG1139 – proton coupled amino acid transporter-like protein ; TMEM 165 and 265 – transmembrane protein 165 or 265 ; CTL – choline like transporter ; RE 6 and 10 – Endoplasmic Reticulum membrane protein complex subunit 6 or 10 ; ZIP 11 – Zinc transporter 11. La localisation des protéines candidates interagissant en système de double hybride a été essentiellement déduite de celle décrite pour des protéines homologues chez les mammifères. Sur cette base hypothétique, le virus pourrait se localiser, après interaction avec certaines de ces protéines, dans des vésicules de la voie endocytaire telles que les endosomes mais il aurait la capacité d'échapper à la dégradation en détournant/bloquant la maturation des endosomes tardifs en lysosomes, peut-être grâce à l'interaction de la CP avec la protéine TMEM 165 (qui joue un rôle important dans l'acidification des endosomes – **Potelle et al. 2017**). Par la suite, le FBNSV pourrait s'accumuler dans ces vésicules multi-membranaires (cf. chapitre 1). Les protéines candidates localisées au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi pourraient indiquer que, comme pour de nombreux virus (**Grangeon et al. 2012; Ravindran et al. 2016; Wild et al. 2018**), le FBNSV transiterait par ces deux compartiments pour sortir de la cellule. Bien évidemment, La localisation de l'ensemble des candidats ainsi que les trajets subcellulaires restent très hypothétiques et demandent confirmation aussi bien au niveau de la réalité des interactions qu'à celui de la localisation subcellulaire du virus et de ces protéines candidates de l'AMG du puceron.

F. Une fois la barrière intestinale franchie, le virus transite dans l'hémolymphe jusqu'aux glandes salivaires principales du puceron par des mécanismes non connus.

G. Dans les glandes salivaires principales, le virus se localise dans les cellules de type 3 et 4 (cf. chapitre 1), même si l'ADN viral n'est pour le moment pas localisé ou localisable dans les cellules de type 3. Le puceron virulifère inoculera le virus avec sa salive lors de sa prise de nourriture. Malgré la co-localisation des segments dans les AMG et les PSG (cf. chapitres 1, 2 et 3), les plantes inoculées peuvent développer une infection dans laquelle l'un des segments viraux est manquant. Des connaissances complémentaires sur les

glandes salivaires, dont la dernière description détaillée a été réalisée en 1972 par Ponsen, permettrait de mieux comprendre comment s'effectue le passage du virus à travers cet organe. Enfin, nous ne sommes qu'au début de l'étude des effecteurs salivaires inoculés par le puceron dans la plante, molécules qui pourraient également jouer un rôle dans l'inoculation du virus (**Boulain 2017**). Quelques rares publications ont décrit une localisation de certains effecteurs dans des types cellulaires précis des PSG (**Mutti et al. 2008; Wang et al. 2015**), et il semble que ce soit aussi les cellules de type 4. L'association de travaux sur les différents types cellulaires, les effecteurs produits et les virus transmis par puceron à travers les glandes salivaires principales pourrait permettre de réaliser une cartographie fonctionnelle précise de cet organe et entraînerait une avancée majeure dans la compréhension des modalités d'inoculation des (nano)virus par leur vecteur.

Références hors chapitre

- Aktar, Md. W., D. Sengupta, et A. Chowdhury. 2009. « Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards ». *Interdisciplinary Toxicology* 2(1):1-12. doi: 10.2478/v10102-009-0001-7.
- Ali, M., S. Anwar, M. N. Shuja, R. K. Tripathi, et Jaswinder Singh. 2018. « The Genus Luteovirus from Infection to Disease ». *European Journal of Plant Pathology* 151(4):841-60. doi: 10.1007/s10658-018-1425-8.
- Ammar el, D., C. W. Tsai, A. E. Whitfield, M. G. Redinbaugh, et S. A. Hogenhout. 2009. « Cellular and Molecular Aspects of Rhabdovirus Interactions with Insect and Plant Hosts ». *Annu Rev Entomol* 54:447-68.
- Anon. 2011. « Microbiology by Numbers ». *Nature Reviews Microbiology* 9(9):628-628. doi: 10.1038/nrmicro2644.
- Anon. s. d. « Plant Virology - 5th Edition ». Consulté 14 septembre 2020 (<https://www.elsevier.com/books/plant-virology/hull/978-0-12-384871-0>).
- Aronson, M. N., A. D. Meyer, J. Gyorgyey, L. Katul, H. J. Vetten, B. Gronenborn, et T. Timchenko. 2000. « Clink, a Nanovirus-Encoded Protein, Binds Both PRB and SKP1 ». *J Virol* 74(7):2967-72.
- Backus, E. A. 1985. « Anatomical and Sensory Mechanisms of Leafhopper and Planthopper Feeding Behavior. » *The Leafhoppers and Planthoppers* 163-94.
- Barker, H., et H. G. Smith, éd. 1999. *The Luteoviridae*. Wallingford: CABI Pub.
- Bawden, F. C., N. W. Pirie, J. D. Bernal, et I. Fankuchen. 1936. « Liquid Crystalline Substances from Virus-Infected Plants ». *Nature* 138:1051-52. doi: 10.1038/1381051a0.
- Becker, N., L. Rimbaud, F. Chiroleu, B. Reynaud, G. Thébaud, et J. M. Lett. 2015. « Rapid Accumulation and Low Degradation: Key Parameters of Tomato Yellow Leaf Curl Virus Persistence in Its Insect Vector Bemisia Tabaci ». *Scientific Reports* 5:17696. doi: 10.1038/srep17696.
- Bisaro, D. M., W. D. Hamilton, R. H. Coutts, et K. W. Buck. 1982. « Molecular cloning and characterisation of the two DNA components of tomato golden mosaic virus. » *Nucleic Acids Research* 10(16):4913-22.

- Blanc, S., Martin D., et M. Uzeš. 2014. « Localizing Viruses in Their Insect Vectors ». *Annual Review of Phytopathology* 52(1):403-25. doi: 10.1146/annurev-phyto-102313-045920.
- Blanc, S., et S. Gutiérrez. 2015. « The Specifics of Vector Transmission of Arboviruses of Vertebrates and Plants ». *Current Opinion in Virology* 15:27-33. doi: 10.1016/j.coviro.2015.07.003.
- Boulain, H. 2017. « Diversité, caractéristiques évolutives et rôles des effecteurs salivaires du puceron du pois dans l'interaction avec ses plantes hôtes ». These de doctorat, Rennes, Agrocampus Ouest.
- Bouvaine, S., N. Boonham, et A. E. Douglas. 2011. « Interactions between a Luteovirus and the GroEL Chaperonin Protein of the Symbiotic Bacterium *Buchnera Aphidicola* of Aphids ». *J Gen Virol* 92(Pt 6):1467-74.
- Bragard, C., P. Caciagli, O. Lemaire, J. J. Lopez-Moya, S. MacFarlane, D. Peters, P. Susi, et L. Torrance. 2013. « Status and Prospects of Plant Virus Control through Interference with Vector Transmission ». *Annu Rev Phytopathol* 51:177-201.
- Brault, V., E. Herrbach, et C. Reinbold. 2007. « Electron Microscopy Studies on Luteovirid Transmission by Aphids ». *Micron* 38(3):302-12.
- Brault, V., J. Mutterer, D. Scheidecker, M. T. Simonis, E. Herrbach, K. Richards, et V. Ziegler-Graff. 2000. « Effects of point mutations in the readthrough domain of the beet western yellows virus minor capsid protein on virus accumulation in planta and on transmission by aphids ». *J Virol* 74(3):1140-48.
- Brault, V., M. Uzeš, B. Monsion, E. Jacquot, et S. Blanc. 2010. « Aphids as Transport Devices for Plant Viruses ». *C R Biol* 333(6-7):524-38.
- Bressan, A., et S. Watanabe. 2011. « Immunofluorescence Localisation of Banana Bunchy Top Virus (Family Nanoviridae) within the Aphid Vector, *Pentalonia nigronervosa*, Suggests a Virus Tropism Distinct from Aphid-Transmitted Luteoviruses ». *Virus Res* 155(2):520-25.
- Bridson, R. W., et P. G. Markham. 2000. « Cotton Leaf Curl Virus Disease ». *Virus Research* 71(1):151-59. doi: 10.1016/S0168-1702(00)00195-7.
- Bridson, R. W., J. Heydarnejad, F. Khosrowfar, H. Massumi, D. P. Martin, et A. Varsani. 2010. « Turnip Curly Top Virus, a Highly Divergent Geminivirus Infecting Turnip in Iran ». *Virus Research* 152(1):169-75. doi: 10.1016/j.virusres.2010.05.016.
- Brown, D. J., et S. A. MacFarlane. 2001. « "Worms" that transmit viruses ». *Biologist (London)* 48(1):35-40.
- Campbell, R. N. 1996. « Fungal Transmission of Plant Viruses ». *Annu Rev Phytopathol* 34:87-108.
- Carn, V. M. 1996. « The role of dipterous insects in the mechanical transmission of animal viruses ». *Br Vet J* 152:377-93.
- Chen, A. Y., G. P. Walker, D. Carter, et J. C. Ng. 2011. « A Virus Capsid Component Mediates Virion Retention and Transmission by Its Insect Vector ». *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(40):16777-82.
- Chen, H., Q. Chen, T. Omura, T. Uehara-Ichiki, et T. Wei. 2011. « Sequential Infection of Rice Dwarf Virus in the Internal Organs of Its Insect Vector after Ingestion of Virus ». *Virus Res* 160(1-2):389-94.
- Chu, P. W. G., K. Paul, Q. Bing-sheng, P. M. Waterhouse, et W. L. Gerlach. 1993. « Putative Full-Length Clones of the Genomic DNA Segments of Subterranean Clover Stunt Virus and Identification of the Segment Coding for the Viral Coat Protein ». *Virus Research* 27(2):161-71. doi: 10.1016/0168-1702(93)90079-3.

- Czosnek, H., M. Ghanim, et M. Ghanim. 2002. « The Circulative Pathway of Begomoviruses in the Whitefly Vector *Bemisia Tabaci* - Insights from Studies with Tomato Yellow Leaf Curl Virus ». *Annals of Applied Biology* 140(3):215-31.
- Czosnek, H., et M. Ghanim. 2012. « Back to Basics: Are Begomoviruses Whitefly Pathogens? » *Journal of Integrative Agriculture* 11(2):225-34. doi: 10.1016/S2095-3119(12)60007-0.
- Czosnek, H., A. Hariton-Shalev, I. Sobol, R. Gorovits, et M. Ghanim. 2017. « The Incredible Journey of Begomoviruses in Their Whitefly Vector ». *Viruses* 9(10). doi: 10.3390/v9100273.
- Day, M. F. Cooper, 1915-, et Margaret J. Bennetts. 1954. « Review of Problems of Specificity in Arthropod Vectors of Plant and Animal Viruses ».
- Dietzgen, R. G., K. S. Mann, et K. N. Johnson. 2016. « Plant Virus–Insect Vector Interactions: Current and Potential Future Research Directions ». *Viruses* 8(11). doi: 10.3390/v8110303.
- Domier, L. L., et C. J. D'Arcy. 2008. « Luteoviruses ». P. 231-38 in *Encyclopedia of Virology (Third Edition)*, édité par B. W. J. Mahy et M. H. V. Van Regenmortel. Oxford: Academic Press.
- Eriksson-Quensel, Inga-Britta, et The Svedberg. 1936. « Sedimentation and Electrophoresis of the Tobacco-Mosaic Virus Protein ». *Journal of the American Chemical Society* 58(10):1863-67. doi: 10.1021/ja01301a010.
- Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, et L. A. Ball. 2005. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press.
- Fereres, A., et B. Raccah. 2015. « Plant Virus Transmission by Insects ». P. 1-12 in *eLS*. American Cancer Society.
- Filichkin, S. A., S. Brumfield, T. P. Filichkin, et M. J. Young. 1997. « In vitro interactions of the aphid endosymbiotic SymL chaperonin with barley yellow dwarf virus ». *J Virol* 71(1):569-77.
- Forbes, A. R. 1977. « The mouthparts and feeding mechanism of aphids ». P. 83-103 in *Aphids as Virus Vectors*, édité par K. F. Harris Maramorosch K.
- Franz, A., K. M. Makkouk, et H. J. Vetten. 1997. « Host range of faba bean necrotic yellows virus and potential yield loss in infected faba bean ». *Phytopathol Medit* 36:94-103.
- Franz, A., K. M. Makkouk, et H. J. Vetten. 1998. « Acquisition, Retention and Transmission of Faba Bean Necrotic Yellows Virus by Two of Its Aphid Vectors, *Aphis Craccivora* (Koch) and *Acyrtosiphon Pisum* (Harris) ». *Journal of Phytopathology* 146(7):347-55.
- Franz, A. W., F. van der Wilk, M. Verbeek, A. M. Dulleman, et J. F. van den Heuvel. 1999. « Faba Bean Necrotic Yellows Virus (Genus Nanovirus) Requires a Helper Factor for Its Aphid Transmission ». *Virology* 262(1):210-19.
- Froissart, R., Y. Michalakakis, et S. Blanc. 2002. « Helper Component-Transcomplementation in the Vector Transmission of Plant Viruses ». *Phytopathology* 92(6):576-79.
- Fulton, J. P., R. C. Gergerich, et H. A. Scott. 1987. « Beetle transmission of plant viruses ». *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:111-23.
- Gallet, R., F. Fabre, G. Thébaud, M. T. Sofonea, A. Sicard, S. Blanc, et Y. Michalakakis. 2018. « Small Bottleneck Size in a Highly Multipartite Virus during a Complete Infection Cycle ». *Journal of Virology* 92(14). doi: 10.1128/JVI.00139-18.
- Garret, A., C. Kerlan, et D. Thomas. 1996. « Ultrastructural study of acquisition and retention of potato leafroll luteovirus in the alimentary canal of its aphid vector, *Myzus persicae* Sulz ». *Arch Virol* 141(7):1279-92.

- Ghanim, M., M. Brumin, et S. Popovski. 2009. « A Simple, Rapid and Inexpensive Method for Localization of Tomato Yellow Leaf Curl Virus and Potato Leafroll Virus in Plant and Insect Vectors ». *J Virol Methods* 159(2):311-14.
- Ghosh, S., S. Kanakala, G. Lebedev, S. Kontsedalov, D. Silverman, T. Alon, N. Mor, N. Sela, N. Luria, A. Dombrovsky, M. Mawassi, S. Haviv, H. Czosnek, et M. Ghanim. 2019. « Transmission of a New Polerovirus Infecting Pepper by the Whitefly Bemisia Tabaci ». *Journal of Virology* 93(15). doi: 10.1128/JVI.00488-19.
- Gildow, F. E. 1987. « Virus-membrane interactions involved in circulative transmission of luteoviruses by pahids ». *Curr Top Vector Res* 4:93-120.
- Gildow, F. E., B. Reavy, M. A. Mayo, G. H. Duncan, J. A. Woodford, J. W. Lamb, et R. T. Hay. 2000. « Aphid Acquisition and Cellular Transport of Potato Leafroll Virus-like Particles Lacking P5 Readthrough Protein ». *Phytopathology* 90(10):1153-61.
- Gildow, FE. 1985. « Transcellular transport of Barley Yellow Dwarf Virus into the hemocoel of the aphid vector, Rhopalosiphum padi ». *Phytopathology* 75:292-97.
- Gildow, FE. 1993. « Evidence for receptor-mediated endocytosis regulating luteovirus acquisition by aphids ». *Phytopathology* 83:270-77.
- Gottlieb, Y., E. Zchori-Fein, N. Mozes-Daube, S. Kontsedalov, M. Skaljic, M. Brumin, I. Sobol, H. Czosnek, F. Vavre, F. Fleury, et M. Ghanim. 2010. « The Transmission Efficiency of Tomato Yellow Leaf Curl Virus by the Whitefly Bemisia Tabaci Is Correlated with the Presence of a Specific Symbiotic Bacterium Species ». *J Virol* 84(18):9310-17.
- Götz, M., S. Popovski, M. Kollenberg, R. Gorovits, J. K. Brown, J. M. Cicero, H. Czosnek, S. Winter, et M. Ghanim. 2012. « Implication of Bemisia Tabaci Heat Shock Protein 70 in Begomovirus-Whitefly Interactions ». *Journal of Virology* 86(24):13241-52. doi: 10.1128/JVI.00880-12.
- Govier, D. A., et B. Kassanis. 1974a. « A virus induced component of plant sap needed when aphids acquire potato virus Y from purified preparations ». *Virology* 61:420-26.
- Govier, D. A., et B. Kassanis. 1974b. « Evidence That a Component Other than the Virus Particle Is Needed for Aphid Transmission of Potato Virus Y ». *Virology* 57(1):285-86. doi: 10.1016/0042-6822(74)90129-9.
- Grangeon, R., M. Agbeci, J. Chen, G. Grondin, H. Zheng, et J. F. Laliberté. 2012. « Impact on the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus of Turnip Mosaic Virus Infection ». *Journal of Virology* 86(17):9255-65. doi: 10.1128/JVI.01146-12.
- Gray, S., et F. E. Gildow. 2003. « Luteovirus-aphid interactions ». *Annu Rev Phytopathol* 41:539-66.
- Gray, S. M., et N. Banerjee. 1999. « Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses ». *Microbiol Mol Biol Rev* 63(1):128-48.
- Gray, S., M. Cilia, et M. Ghanim. 2014. « Chapter Four - Circulative, "Nonpropagative" Virus Transmission: An Orchestra of Virus-, Insect-, and Plant-Derived Instruments ». P. 141-99 in *Advances in Virus Research*. Vol. 89, édité par K. Maramorosch et F. A. Murphy. Academic Press.
- Grigoras, I., T. Timchenko, L. Katul, A. Grande-Perez, H. J. Vetten, et B. Gronenborn. 2009. « Reconstitution of Authentic Nanovirus from Multiple Cloned DNAs ». *J Virol* 83(20):10778-87.
- Grigoras, I., H. J. Vetten, U. Commandeur, H. Ziebell, B. Gronenborn, et T. Timchenko. 2018. « Nanovirus DNA-N Encodes a Protein Mandatory for Aphid Transmission ». *Virology* 522:281-91. doi: 10.1016/j.virol.2018.07.001.
- Gronenborn, B., et H. J. Vetten. 2020. « Nanoviruses (Nanoviridae)☆ ». in *Reference Module in Life Sciences*. Elsevier.

- Grove, J., et M. Marsh. 2011. « The cell biology of receptor-mediated virus entry ». *Journal of Cell Biology* 195(7):1071-82. doi: 10.1083/jcb.201108131.
- Gutiérrez, S., Y. Michalakakis, M. Van Munster, et S. Blanc. 2013. « Plant feeding by insect vectors can affect life cycle, population genetics and evolution of plant viruses ». *Functional Ecology* 27:610-22. doi: 10.1111/1365-2435.12070.
- Hanley-Bowdoin, L., S. B. Settlage, B. M. Orozco, S. Nagar, et D. Robertson. 2000. « Geminiviruses: Models for Plant DNA Replication, Transcription, and Cell Cycle Regulation ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35(2):105-40.
- Harris, K. F. 1977. « An ingestion-egestion hypothesis of non circulative virus transmission ». P. 166-208 in *Aphids as virus vectors*, édité par K. F. Harris et K. Maramorosch. New-York: Academic Press.
- He, Y. Z., Y. M. Wang, T. Y. Yin, E. Fiallo-Olivé, Y. Q. Liu, L. Hanley-Bowdoin, et X. W. Wang. 2020. « A Plant DNA Virus Replicates in the Salivary Glands of Its Insect Vector via Recruitment of Host DNA Synthesis Machinery ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117(29):16928-37. doi: 10.1073/pnas.1820132117.
- Hogenhout, S. A., D. Ammar el, A. E. Whitfield, et M. G. Redinbaugh. 2008. « Insect Vector Interactions with Persistently Transmitted Viruses ». *Annu Rev Phytopathol* 46:327-59.
- Horser, C. L., R. M. Harding, et J. L. Dale. 2001. « Banana Bunchy Top Nanovirus DNA-1 Encodes the “master” Replication Initiation Protein ». *The Journal of General Virology* 82(Pt 2):459-64. doi: 10.1099/0022-1317-82-2-459.
- Hubbard, C., D. Singleton, M. Rauch, S. Jayasinghe, D. Cafiso, et D. Castle. 2000. « The Secretory Carrier Membrane Protein Family: Structure and Membrane Topology ». *Molecular Biology of the Cell* 11(9):2933-47.
- Hunter, W. B., et D. E. Ullman. 1992. « Anatomy and ultrastructure of the piercing-sucking mouthparts and paraglossal sensilla of *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) ». *Int J Insect Morphol and Embryol* 21:17-35.
- Irwin, M. E. 1999. « Implications of Movement in Developing and Deploying Integrated Pest Management Strategies ». *Agricultural and Forest Meteorology* 97(4):235-48. doi: 10.1016/S0168-1923(99)00069-6.
- Iwanowski, D. 1903. « Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze ». *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten* 13(1):1-41.
- Jebakumar, R. M., V. Balasubramanian, et R. Selvarajan. 2018. « Virus titre determines the efficiency of *Pentalonia nigronervosa* (Aphididae: Hemiptera) to transmit banana bunchy top virus ». *VirusDisease* 29(4):499-505. doi: 10.1007/s13337-018-0493-x.
- Jeger, Michael J. 2020. « The Epidemiology of Plant Virus Disease: Towards a New Synthesis ». *Plants* 9(12):1768. doi: 10.3390/plants9121768.
- Jeske, H. 2009. « Geminiviruses ». P. 185-226 in *TT Viruses: The Still Elusive Human Pathogens, Current Topics in Microbiology and Immunology*, édité par E.-M. de Villiers et H. zur Hausen. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Ji, X., N. Yu, L. Qu, B. Li, et Z. Liu. 2019. « Banana Bunchy Top Virus (BBTV) Nuclear Shuttle Protein Interacts and Re-Distributes BBTV Coat Protein in *Nicotiana Benthamiana* ». *3 Biotech* 9(4):121. doi: 10.1007/s13205-019-1656-1.
- Kakani, K., R. Reade, et D. Rochon. 2004. « Evidence that vector transmission of a plant virus requires conformational change in virus particles ». *J Mol Biol* 338(3):507-17.
- Kanakala, S., et M. Ghanim. 2016. « Implication of the Whitefly *Bemisia tabaci* Cyclophilin B Protein in the Transmission of Tomato yellow leaf curl virus ». *Frontiers in Plant Science* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.01702.

- Katul, L., E. Maiss, S. Y. Morozov, et H. J. Vetten. 1997. « Analysis of Six DNA Components of the Faba Bean Necrotic Yellows Virus Genome and Their Structural Affinity to Related Plant Virus Genomes ». *Virology* 233(2):247-59. doi: 10.1006/viro.1997.8611.
- Katul, U., H. J. Vetten, E. Maiss, K. M. Makkouk, D. E. Lesemann, et R. Casper. 1993. « Characterisation and Serology of Virus-like Particles Associated with Faba Bean Necrotic Yellows ». *Annals of Applied Biology* 123(3):629-47. doi: 10.1111/j.1744-7348.1993.tb04933.x.
- Kausche, G. A., E. Pfankuch, et H. Ruska. 1939. « Die Sichtbarmachung von pflanzlichem Virus im Übermikroskop ». *Naturwissenschaften* 27(18):292-99. doi: 10.1007/BF01493353.
- Kennedy, J. S., M. F. Day, et V. F. Eastop. 1962. *A conspectus of aphids as vectors of plant viruses*. London: Commonwealth Inst. Entomol.
- Kliot, A., et M. Ghanim. 2013. « The Role of Bacterial Chaperones in the Circulative Transmission of Plant Viruses by Insect Vectors ». *Viruses* 5(6):1516-35. doi: 10.3390/v5061516.
- Kozłowska-Makulska, A., H. Guilley, M. S. Szyndel, M. Beuve, O. Lemaire, E. Herrbach, et S. Bouzoubaa. 2010. « P0 proteins of European beet-infecting poleroviruses display variable RNA silencing suppression activity ». *Journal of General Virology* 91(4):1082-91. doi: 10.1099/vir.0.016360-0.
- Krenz, B., I. Schießl, E. Greiner, et S. Krapp. 2017. « Analyses of Pea Necrotic Yellow Dwarf Virus-Encoded Proteins ». *Virus Genes* 53(3):454-63. doi: 10.1007/s11262-017-1439-x.
- Law, A. H. Y., C. M. Chow, et L. Jiang. 2012. « Secretory Carrier Membrane Proteins ». *Protoplasma* 249(2):269-83. doi: 10.1007/s00709-011-0295-0.
- Lefeuve, P., D. P. Martin, G. Harkins, P. Lemey, A. J. A. Gray, S. Meredith, F. Lakay, A. Monjane, J. M. Lett, A. Varsani, et J. Heydarnejad. 2010. « The Spread of Tomato Yellow Leaf Curl Virus from the Middle East to the World ». *PLOS Pathogens* 6(10):e1001164. doi: 10.1371/journal.ppat.1001164.
- Levy, A., et H. Czosnek. 2003. « The DNA-B of the non-phloem-limited bean dwarf mosaic virus (BDMV) is able to move the phloem-limited Abutilon mosaic virus (AbMV) out of the phloem, but DNA-B of AbMV is unable to confine BDMV to the phloem ». *Plant Mol Biol* 53(6):789-803.
- Linz, L. B., S. Liu, N. P. Chougule, et B. C. Bonning. 2015. « In Vitro Evidence Supports Membrane Alanine Aminopeptidase N as a Receptor for a Plant Virus in the Pea Aphid Vector ». *Journal of Virology* 89(22):11203-12. doi: 10.1128/JVI.01479-15.
- Liu, S., S. Sivakumar, Z. Wang, B. C. Bonning, et W. Allen Miller. 2009. « The Readthrough Domain of Pea Enation Mosaic Virus Coat Protein Is Not Essential for Virus Stability in the Hemolymph of the Pea Aphid ». *Archives of Virology* 154(3):469-79. doi: 10.1007/s00705-009-0327-7.
- Lucía-Sanz, A., et S. Manrubia. 2017. « Multipartite Viruses: Adaptive Trick or Evolutionary Treat? ». *Npj Systems Biology and Applications* 3(1):1-11. doi: 10.1038/s41540-017-0035-y.
- Lucy, A. P. (Norwich Research Park, M. I. Boulton, J. W. Davies, et A. J. Maule. 1996. « Tissue Specificity of Zea Mays Infection by Maize Streak Virus ». *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI (USA)*.
- MacFarlane, S. A., N. Vassilakos, et D. J. Brown. 1999. « Similarities in the genome organization of tobacco rattle virus and pea early-browning virus isolates that are transmitted by the same vector nematode ». *J Gen Virol* 80 (Pt 1):273-76.
- MacFarlane, S. A., et D. J. Robinson. 2004. « Transmission of plant viruses by nematodes ». P. 263-86 in *Microbe-vector Interactions in Vector-borne Diseases, Society for*

General Microbiology Symposia, édité par A. Osbourn, G. L. Smith, et S. H. Gillespie. Cambridge: Cambridge University Press.

- Mandal, B. 2010. « Advances in Small Isometric Multicomponent ssDNA Viruses Infecting Plants ». *Indian journal of virology: an official organ of Indian Virological Society* 21(1):18-30. doi: 10.1007/s13337-010-0010-3.
- Mangwende, T., M. L. Wang, W. Borth, J. Hu, P. H. Moore, T. E. Mirkov, et H. H. Albert. 2009. « The P0 Gene of Sugarcane Yellow Leaf Virus Encodes an RNA Silencing Suppressor with Unique Activities ». *Virology* 384(1):38-50. doi: 10.1016/j.virol.2008.10.034.
- Mao, Q., W. Wu, Z. Liao, J. Li, D. Jia, X. Zhang, Q. Chen, H. Chen, J. Wei, et T. Wei. 2019. « Viral Pathogens Hitchhike with Insect Sperm for Paternal Transmission ». *Nature Communications* 10(1):955. doi: 10.1038/s41467-019-08860-4.
- Martin, B., J. L. Collar, W. F. Tjallingii, et A. Fereres. 1997. « Intracellular ingestion and salivation by aphids may cause the acquisition and inoculation of non-persistently transmitted plant viruses ». *J. Gen. Virol.* 78(10):2701-5.
- Mercer, J., M. Schelhaas, et A. Helenius. 2010. « Virus Entry by Endocytosis ». *Annual Review of Biochemistry* 79(1):803-33. doi: 10.1146/annurev-biochem-060208-104626.
- Miller, W. A. 1999. « Luteovirus (*Luteoviridae*) ». *Encyclopedia of Virology* 901-8. doi: 10.1006/rwvi.1999.0170.
- Miller, W. A., S. Liu, et R. Beckett. 2002. « Barley Yellow Dwarf Virus: Luteoviridae or Tombusviridae? ». *Molecular Plant Pathology* 3(4):177-83. doi: 10.1046/j.1364-3703.2002.00112.x.
- Moffat, A. S. 1999. « Geminiviruses Emerge as Serious Crop Threat ». *Science* 286(5446):1835-1835. doi: 10.1126/science.286.5446.1835.
- Mulot, M., B. Monsion, S. Boissinot, M. Rastegar, S. Meyer, N. Bochet, et V. Brault. 2018. « Transmission of Turnip Yellows Virus by *Myzus Persicae* Is Reduced by Feeding Aphids on Double-Stranded RNA Targeting the Ephrin Receptor Protein ». *Frontiers in Microbiology* 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.00457.
- Mutti, N. S., J. Louis, L. K. Pappan, K. Pappan, K. Begum, M. S. Chen, Y. Park, N. Dittmer, J. Marshall, J. C. Reese, et G. R. Reeck. 2008. « A Protein from the Salivary Glands of the Pea Aphid, *Acyrtosiphon Pisum*, Is Essential in Feeding on a Host Plant ». *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(29):9965-69.
- Ng, J. C., et B. W. Falk. 2006. « Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses ». *Annu Rev Phytopathol* 44:183-212.
- Ng, J. C. K., et K. L. Perry. 2004. « Transmission of Plant Viruses by Aphid Vectors ». *Molecular Plant Pathology* 5(5):505-11. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00240.x>.
- Ohnesorge, S., et E. R. Bejarano. 2009. « Begomovirus Coat Protein Interacts with a Small Heat-Shock Protein of Its Transmission Vector (*Bemisia Tabaci*) ». *Insect Mol Biol* 18(6):693-703.
- Ohnishi, J., T. Kitamura, F. Terami, et K. Honda. 2009. « A Selective Barrier in the Midgut Epithelial Cell Membrane of the Nonvector Whitefly *Trialeurodes Vaporariorum* to Tomato Yellow Leaf Curl Virus Uptake ». *Journal of General Plant Pathology* 75(2):131-39. doi: 10.1007/s10327-009-0147-3.
- Pakkianathan, B. C., S. Kontsedalov, G. Lebedev, A. Mahadav, M. Zeidan, H. Czosnek, et M. Ghanim. 2015. « Replication of Tomato Yellow Leaf Curl Virus in Its Whitefly Vector, *Bemisia Tabaci* ». *Journal of Virology* 89(19):9791-9803. doi: 10.1128/JVI.00779-15.
- Pan, L. L., Q. F. Chen, J. J. Zhao, T. Guo, X. W. Wang, A. Hariton-Shalev, H. Czosnek, et S. S. Liu. 2017. « Clathrin-Mediated Endocytosis Is Involved in Tomato Yellow Leaf Curl

- Virus Transport across the Midgut Barrier of Its Whitefly Vector ». *Virology* 502:152-59. doi: 10.1016/j.virol.2016.12.029.
- Parkinson, J. (1567-1650) Auteur du texte. 1629. « *Paradisi in sole. Paradisus terrestris* », or a Garden of all sorts of pleasant flowers which our English ayre will permitt to be noursed up, with a kitchen garden of all manner of herbes, rootes and fruites for meate or sause... and an orchard of all sorte of fruitbearing trees and shrubbes... By John Parkinson,...
- Peter, K. A., D. L. Liang, P. Palukaitis, et S. M. Gray. 2008. « Small Deletions in the Potato Leafroll Virus Readthrough Protein Affect Particle Morphology, Aphid Transmission, Virus Movement and Accumulation ». *Journal of General Virology* 89:2037-45.
- Pirone, T. P. 1964. « Aphid transmission of a purified stylet-borne virus acquired through membrane ». *Virology* 23:107-8.
- Pollard, D. G. 1977. « Chapter 4 - Aphid Penetration of Plant Tissues ». P. 105-18 in *Aphids As Virus Vectors*, édité par K. F. Harris et K. Maramorosch. Academic Press.
- Potelle, S., E. Dulary, S. Duvet, W. Morelle, D. Vicogne, C. Spriet, M. A. Krzewinski-Recchi, T. Marquardt, G. deBettignies, G. Matthijs, V. Lupashin, et F. Foulquier. 2017. « Manganese-induced trafficking and turnover of TMEM165 ». *The Biochemical journal* 474(9):1481-93. doi: 10.1042/BCJ20160910.
- Powell, G. 2005. « Intracellular salivation is the aphid activity associated with inoculation of non-persistently transmitted viruses ». *J Gen Virol* 86(Pt 2):469-72.
- Powell, G., C. R. Tosh, et J. Hardie. 2006. « Host Plant Selection by Aphids: Behavioral, Evolutionary, and Applied Perspectives ». *Annual Review of Entomology* 51:309-30. doi: 10.1146/annurev.ento.51.110104.151107.
- Prado, E., et W. F. Tjallingii. 1994. « Aphid activities during sieve element punctures ». *Entomologia experimentalis et applicata* 72:157-65.
- Ramesh, S. V., P. P. Sahu, M. Prasad, S. Praveen, et H. R. Pappu. 2017. « Geminiviruses and Plant Hosts: A Closer Examination of the Molecular Arms Race ». *Viruses* 9(9). doi: 10.3390/v9090256.
- Rana, V. S., S. T. Singh, N. G. Priya, J. Kumar, et R. Rajagopal. 2012. « Arsenophonus GroEL Interacts with CLCuV and Is Localized in Midgut and Salivary Gland of Whitefly B. Tabaci ». *PLoS One* 7(8):e42168.
- Rana, V. S., S. Popli, G. K. Saurav, H. S. Raina, R. Chaubey, V. V. Ramamurthy, et R. Rajagopal. 2016. « A Bemisia Tabaci Midgut Protein Interacts with Begomoviruses and Plays a Role in Virus Transmission ». *Cellular Microbiology* 18(5):663-78. doi: 10.1111/cmi.12538.
- Rana, V. S., S. Popli, G. K. Saurav, H. S. Raina, R. Jamwal, R. Chaubey, V. V. Ramamurthy, K. Natarajan, et R. Rajagopal. 2019. « Implication of the Whitefly, Bemisia tabaci, Collagen Protein in Begomoviruses Acquisition and Transmission ». *Phytopathology*® 109(8):1481-93. doi: 10.1094/PHYTO-03-18-0082-R.
- Ravindran, M. S., P. Bagchi, C. N. Cunningham, et B. Tsai. 2016. « Opportunistic Intruders: How Viruses Orchestrate ER Functions to Infect Cells ». *Nature Reviews Microbiology* 14(7):407-20. doi: 10.1038/nrmicro.2016.60.
- Reinbold, C., F. E. Gildow, E. Herrbach, V. Ziegler-Graff, M. C. Goncalves, J. F. van Den Heuvel, et V. Brault. 2001. « Studies on the role of the minor capsid protein in transport of Beet western yellows virus through Myzus persicae ». *J Gen Virol* 82(Pt 8):1995-2007.
- Reinbold, C., E. Herrbach, et V. Brault. 2003. « Posterior midgut and hindgut are both sites of acquisition of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Myzus persicae and Aphis gossypii ». *J Gen Virol* 84(Pt 12):3473-84.

- Roumagnac, P., M. Granier, P. Bernardo, M. Deshoux, R. Ferdinand, S. Galzi, E. Fernandez, C. Julian, I. Abt, D. Filloux, F. Mesléard, A. Varsani, S. Blanc, D. P. Martin, et M. Peterschmitt. 2015. « Alfalfa Leaf Curl Virus: An Aphid-Transmitted Geminivirus ». *Journal of Virology* 89(18):9683. doi: 10.1128/JVI.00453-15.
- R.y, Wang, Gergerich R.c, et Kim K.s. 1994. « Entry of Ingested Plant Viruses into the Hemocoel of the Beetle Vector *Diabrotica Undecimpunctata Howardi*. » *Phytopathology*.
- Ryckebusch, F., N. Sauvion, M. Granier, P. Roumagnac, et M. Peterschmitt. 2020. « Alfalfa Leaf Curl Virus Is Transmitted by *Aphis Craccivora* in a Highly Specific Circulative Manner ». *Virology* 546:98-108. doi: 10.1016/j.virol.2020.04.004.
- Sánchez-Campos, S., E. A. Rodríguez-Negrete, L. Cruzado, A. G. Pérez, E. R. Bejarano, J. Navas-Castillo, et E. Moriones. 2016. « Tomato Yellow Leaf Curl Virus: No Evidence for Replication in the Insect Vector *Bemisia Tabaci* ». *Scientific Reports* 6:30942. doi: 10.1038/srep30942.
- Sastry, K. S., et T. A. Zitter. 2014. « Management of Virus and Viroid Diseases of Crops in the Tropics ». P. 149-480 in *Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics: Volume 2: Epidemiology and Management*, édité par K. S. Sastry et T. A. Zitter. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Saurav, G. K., V. S. Rana, S. Popli, G. Daimei, et R. Rajagopal. 2019. « A Thioredoxin-like Protein of *Bemisia Tabaci* Interacts with Coat Protein of Begomoviruses ». *Virus Genes* 55(3):356-67. doi: 10.1007/s11262-019-01657-z.
- Shepherd, D. N., D. P. Martin, E. Van Der Walt, K. Dent, A. Varsani, et E. P. Rybicki. 2009. « Maize streak virus: an old and complex 'emerging' pathogen ». *Molecular Plant Pathology* 11(1):1-12. doi: 10.1111/j.1364-3703.2009.00568.x.
- Shirasawa-Seo, N., Y. Sano, S. Nakamura, T. Murakami, Y. Gotoh, Y. Naito, C. N. Hsia, S. Seo, I. Mitsuhashi, S. Kosugi, et Y. Ohashi. 2005. « The Promoter of Milk Vetch Dwarf Virus Component 8 Confers Effective Gene Expression in Both Dicot and Monocot Plants ». *Plant Cell Reports* 24(3):155-63. doi: 10.1007/s00299-005-0917-0.
- Sicard, A., M. Yvon, T. Timchenko, B. Gronenborn, Y. Michalakis, S. Gutierrez, et S. Blanc. 2013. « Gene Copy Number Is Differentially Regulated in a multipartite Virus ». *Nat Commun* 4:2248.
- Sicard, A., Y. Michalakis, S. Gutiérrez, et S. Blanc. 2016. « The Strange Lifestyle of Multipartite Viruses ». *PLOS Pathogens* 12(11):e1005819. doi: 10.1371/journal.ppat.1005819.
- Sicard, A., E. Pirolles, R. Gallet, M. S. Vernerey, M. Yvon, C. Urbino, M. Peterschmitt, S. Gutierrez, Y. Michalakis, et S. Blanc. 2019. « A multicellular way of life for a multipartite virus » édité par F. García-Arenal, D. Weigel, et F. García-Arenal. *eLife* 8:e43599. doi: 10.7554/eLife.43599.
- Sicard, A., J. L. Zeddani, M. Yvon, Y. Michalakis, S. Gutiérrez, et S. Blanc. 2015. « Circulative Nonpropagative Aphid Transmission of Nanoviruses: an Oversimplified View ». *Journal of Virology* 89(19):9719-26. doi: 10.1128/JVI.00780-15.
- Singh, D., N. Verma, et A. Varma. 2008. « The Fungal Transmitted Viruses ». P. 485-503 in *Mycorrhiza*, édité par A. Varma. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Stanley, W. M. 1935. « Isolation of a Crystalline Protein Possessing the Properties of Tobacco-Mosaic Virus ». *Science* 81(2113):644-45. doi: 10.1126/science.81.2113.644.
- Stewart, L. R., V. Medina, T. Y. Tian, M. Turina, B. W. Falk, et J. C. K. Ng. 2010. « A Mutation in the Lettuce Infectious Yellows Virus Minor Coat Protein Disrupts Whitefly Transmission but Not In Planta Systemic Movement ». *Journal of Virology* 84(23):12165-73.

- Stobbe, A. H., et M. J. Roossinck. 2014. « Plant virus metagenomics: what we know and why we need to know more ». *Frontiers in Plant Science* 5. doi: 10.3389/fpls.2014.00150.
- Stobbs, L. W., G. W. Cross, et M. S. Manocha. 1982. « Specificity and methods of transmission of cucumber necrosis virus by *Olpidium radicale* zoospores ». *Canadian Journal of Plant Pathology* 4(2):134-42. doi: 10.1080/07060668209501314.
- Sylvester, E. S. 1956. « Beet yellows virus transmission by the green peach aphid ». *J. Econ. Entomol.* 49:789-800.
- Tamada, T., et B. D. Harrison. 1981. « Quantitative Studies on the Uptake and Retention of Potato Leafroll Virus by Aphids in Laboratory and Field Conditions ». *Annals of Applied Biology* 98(2):261-76. doi: 10.1111/j.1744-7348.1981.tb00759.x.
- Tang, S. L., Lucas B. Linz, B. C. Bonning, et N. L. B. Pohl. 2015. « Automated Solution-Phase Synthesis of Insect Glycans to Probe the Binding Affinity of Pea Enation Mosaic Virus ». *The Journal of Organic Chemistry* 80(21):10482-89. doi: 10.1021/acs.joc.5b01428.
- Taylor, C. E., et D. J. F. Brown. 1997. « Nematode Vectors of Plant Viruses ». New-York.
- Taylor, C. E., et W. M. Robertson. 1970. « Sites of Virus Retention in the Alimentary Tract of the Nematode Vectors, *Xiphinema Diversicaudatum* (Micol.) and *X. Index* (Thorne and Allen) ». *Ann Appl Biol* 66(3):375-80.
- Temmink, J. H. M., R. N. Campbell, et P. R. Smith. 1970. « Specificity and Site of in vitro Acquisition of Tobacco Necrosis Virus by Zoospores of *Olpidium brassicae* ». *Journal of General Virology*, 9(3):201-13. doi: 10.1099/0022-1317-9-3-201.
- Thackray, D. J., R. A. C. Jones, A. M. Bwye, et B. A. Coutts. 2000. « Further Studies on the Effects of Insecticides on Aphid Vector Numbers and Spread of Cucumber Mosaic Virus in Narrow-Leafed Lupins (*Lupinus Angustifolius*) ». *Crop Protection* 19(2):121-39. doi: 10.1016/S0261-2194(99)00093-9.
- Thresh, J. M., et R. J. Cooter. 2005. « Strategies for Controlling Cassava Mosaic Virus Disease in Africa ». *Plant Pathology* 54(5):587-614. doi: 10.1111/j.1365-3059.2005.01282.x.
- Tian, T., L. Rubio, H. H. Yeh, B. Crawford, et B. W. Falk. 1999. « Lettuce Infectious Yellows Virus: In Vitro Acquisition Analysis Using Partially Purified Virions and the Whitefly *Bemisia Tabaci*. » *Journal of General Virology* 80(5):1111-17. doi: 10.1099/0022-1317-80-5-1111.
- Timchenko, T., L. Katul, Y. Sano, F. de Kouchkovsky, H. J. Vetten, et B. Gronenborn. 2000. « The Master Rep Concept in Nanovirus Replication: Identification of Missing Genome Components and Potential for Natural Genetic Reassortment ». *Virology* 274(1):189-95.
- Timchenko, T., F. de Kouchkovsky, L. Katul, C. David, H. J. Vetten, et B. Gronenborn. 1999. « A Single Rep Protein Initiates Replication of Multiple Genome Components of Faba Bean Necrotic Yellows Virus, a Single-Stranded DNA Virus of Plants ». *J Virol* 73(12):10173-82.
- Uzest, M., D. Gargani, A. Dombrovsky, C. Cazevieille, D. Cot, et S. Blanc. 2010. « The "Acrostyle": A Newly Described Anatomical Structure in Aphid Stylets ». *Arthropod Struct Dev* 39(4):221-29.
- Uzest, M., et S. Blanc. 2016. « CHAPTER 5: Molecular Mechanisms Involved in Noncirculative Virus?Vector Interactions ». P. 59-72 in *Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens, General Plant Pathology*, édité par Marilyne Uzest et Stéphane Blanc. The American Phytopathological Society.

- Van den Heuvel, JFJM, M. Verbeek, et F. van der Wilk. 1994. « Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of Potato Leafroll Virus by *Myzus persicae* ». *Journal of Virology* 75:2559-65.
- Vega-Arreguín, J. C., T. Timchenko, B. Gronenborn, et B. C. Ramírez. 2005. « A Functional Histidine-Tagged Replication Initiator Protein: Implications for the Study of Single-Stranded DNA Virus Replication In Planta ». *Journal of Virology* 79(13):8422. doi: 10.1128/JVI.79.13.8422-8430.2005.
- Vellios, E., D. J. Brown, et S. A. MacFarlane. 2002. « Substitution of a single amino acid in the 2b protein of Pea early-browning virus affects nematode transmission ». *J Gen Virol* 83(Pt 7):1771-75.
- Vetten, H. J., D. Knierim, M. S. Rakoski, W. Menzel, E. Maiss, B. Gronenborn, S. Winter, et B. Krenz. 2019. « Identification of a Novel Nanovirus in Parsley ». *Archives of Virology* 164(7):1883-87. doi: 10.1007/s00705-019-04280-3.
- Wakana, Y., S. Koyama, K. Nakajima, K. Hatsuzawa, M. Nagahama, K. Tani, H. P. Hauri, P. Melançon, et M. Tagaya. 2005. « Reticulon 3 Is Involved in Membrane Trafficking between the Endoplasmic Reticulum and Golgi ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334(4):1198-1205. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.07.012.
- Wang, L. L., X. R. Wang, X. M. Wei, H. Huang, J. X. Wu, X. X. Chen, S. S. Liu, et X. W. Wang. 2016. « The autophagy pathway participates in resistance to tomato yellow leaf curl virus infection in whiteflies ». *Autophagy* 12(9):1560-74. doi: 10.1080/15548627.2016.1192749.
- Wang, R. Y. (University of Arkansas), R. C. Gergerich, et K. S. Kim. 1994. « The Relationship between Feeding and Virus Retention Time in Beetle Transmission of Plant Viruses ». *Phytopathology (USA)*.
- Wang, W., H. Dai, Y. Zhang, R. Chandrasekar, L. Luo, Y. Hiromasa, C. Sheng, G. Peng, S. Chen, J. M. Tomich, J. Reese, O. Edwards, Le Kang, G. Reeck, et F. Cui. 2015. « Armet Is an Effector Protein Mediating Aphid-Plant Interactions ». *The FASEB Journal* 29(5):2032-45. doi: <https://doi.org/10.1096/fj.14-266023>.
- Wang, X. F., et G. H. Zhou. 2003. « Identification of a Protein Associated with Circulative Transmission of Barley Yellow Dwarf Virus from Cereal Aphids, *Schizaphis graminum* and *Sitobion avenae* ». *Chinese Science Bulletin* 48(19):2083-87.
- Wang, X. W., et S. Blanc. 2021. « Insect Transmission of Plant Single-Stranded DNA Viruses ». *Annual Review of Entomology* 66(1):null. doi: 10.1146/annurev-ento-060920-094531.
- Wang, Z. Z., M. Shi, Y. C. Huang, X. W. Wang, D. Stanley, et X. X. Chen. 2016. « A Peptidoglycan Recognition Protein Acts in Whitefly (*Bemisia tabaci*) Immunity and Involves in Begomovirus Acquisition ». *Scientific Reports* 6(1):37806. doi: 10.1038/srep37806.
- Wanitchakorn, R., R. M. Harding, et J. L. Dale. 1997. « Banana Bunchy Top Virus DNA-3 encodes the Viral Coat Protein ». *Archives of Virology* 142(8):1673-80. doi: 10.1007/s007050050188.
- Wanitchakorn, R., G. J. Hafner, R. M. Harding, et J. L. Dale. 2000. « Functional analysis of proteins encoded by banana bunchy top virus DNA-4 to -6 ». *Journal of General Virology*, 81(1):299-306. doi: 10.1099/0022-1317-81-1-299.
- Watanabe, S., D. Borthakur, et A. Bressan. 2013. « Lack of Evidence for an Interaction between Buchnera GroEL and Banana Bunchy Top Virus (Nanoviridae) ». *Virus Res* 177(1):98-102.
- Watanabe, S., et A. Bressan. 2013. « Tropism, Compartmentalization and Retention of Banana Bunchy Top Virus (Nanoviridae) in the Aphid Vector *Pentalonia nigronervosa* ». *J Gen Virol* 94(Pt 1):209-19.

- Watanabe, S., A. M. Greenwell, et A. Bressan. 2013. « Localization, Concentration, and Transmission Efficiency of Banana Bunchy Top Virus in Four Asexual Lineages of Pentalonion Aphids ». *Viruses* 5(2):758-76.
- Watanabe, S., D. Borthakur, et A. Bressan. 2016. « Localization of Banana Bunchy Top Virus and Cellular Compartments in Gut and Salivary Gland Tissues of the Aphid Vector Pentalonion Nigrionervosa ». *Insect Science* 23(4):591-602. doi: 10.1111/1744-7917.12211.
- Watson, M. A., et F. M. Roberts. 1939. « A comparative study of the transmission of hyocymus virus 3, potato virus Y and cucumber virus by the vector Myzus persicae (Sulz), M. circumflexus (Buckton) and Macrosiphum gei (Koch) ». *Proc. R. Soc. London B.* 127:543-76.
- Wei, J., J. J. Zhao, T. Zhang, F. F. Li, M. Ghanim, X. P. Zhou, G. Y. Ye, S. S. Liu, et X. W. Wang. 2014. « Specific Cells in the Primary Salivary Glands of the Whitefly Bemisia tabaci Control Retention and Transmission of Begomoviruses ». *Journal of Virology* 88(22):13460-68. doi: 10.1128/JVI.02179-14.
- Whitfield, A. E., B. W. Falk, et D. Rotenberg. 2015. « Insect Vector-Mediated Transmission of Plant Viruses ». *Virology* 479-480:278-89. doi: 10.1016/j.virol.2015.03.026.
- Wild, P., A. Kaech, E. M. Schraner, L. Walser, et M. Ackermann. 2018. « Endoplasmic reticulum-to-Golgi transitions upon herpes virus infection ». *F1000Research* 6. doi: 10.12688/f1000research.12252.2.
- Xia, W. Q., Y. Liang, Y. Chi, L. L. Pan, J. Zhao, S. S. Liu, et X. W. Wang. 2018. « Intracellular trafficking of begomoviruses in the midgut cells of their insect vector ». *PLoS Pathogens* 14(1). doi: 10.1371/journal.ppat.1006866.
- Xu, J., P. J. De Barro, et S. S. Liu. 2010. « Reproductive Incompatibility among Genetic Groups of Bemisia Tabaci Supports the Proposition That the Whitefly Is a Cryptic Species Complex ». *Bulletin of Entomological Research* 100(3):359-66. doi: 10.1017/S0007485310000015.
- Yarwood, C. E. 1957. « Mechanical Transmission of Plant Viruses ». P. 243-78 in *Advances in Virus Research*. Vol. 4, édité par K. M. Smith et M. A. Lauffer. Academic Press.
- Yu, N., J. Wang, N. Yu, X. Zheng, Q. Zhou, et Z. Liu. 2019. « Bioinformatics Analysis of the Interaction between Coat Protein and Nuclear Shuttle Protein in Babuvirus ». *American Journal of Plant Sciences* 10(4):622-30. doi: 10.4236/ajps.2019.104045.
- Zhang, S. C., C. Wege, et H. Jeske. 2001. « Movement Proteins (BC1 and BV1) of Abutilon Mosaic Geminivirus Are Cotransported in and between Cells of Sink but Not of Source Leaves as Detected by Green Fluorescent Protein Tagging ». *Virology* 290(2):249-60. doi: 10.1006/viro.2001.1185.
- Zhang, W., N. H. Olson, T. S. Baker, L. Faulkner, M. Agbandje-McKenna, M. I. Boulton, J. W. Davies, et R. McKenna. 2001. « Structure of the Maize Streak Virus Geminiate Particle ». *Virology* 279(2):471-77. doi: 10.1006/viro.2000.0739.
- Zhao, J., Y. Chi, X. J. Zhang, X. W. Wang, et S. S. Liu. 2019. « Implication of Whitefly Vesicle Associated Membrane Protein-Associated Protein B in the Transmission of Tomato Yellow Leaf Curl Virus ». *Virology* 535:210-17. doi: 10.1016/j.virol.2019.07.007.
- Zila, V., F. Difato, L. Klimova, S. Huerfano, et J. Forstova. 2014. « Involvement of Microtubular Network and Its Motors in Productive Endocytic Trafficking of Mouse Polyomavirus ». *PLOS ONE* 9(5):e96922. doi: 10.1371/journal.pone.0096922.
- De Zoeten, G. A., M. H. Schultz, J. S. Skaf, et H. Hirata. 2000. « Mutational Evidence That the VPg Is Involved in the Replication and Not the Movement of Pea Enation Mosaic Virus-1 ». *Journal of General Virology* 81(4):1103-9. doi: 10.1099/0022-1317-81-4-1103.

De Zoeten, G. A., et J. S. Skaf. 2001. « Pea Enation Mosaic and the Vagaries of a Plant Virus ». P. 323-50 in *Advances in Virus Research*. Vol. 57. Academic Press.

Annexes

(Manuscrit soumis et refusé dans ISME journal et en cours de preparation pour ressoumission. Cet article est joint en annexe car il représente le résultat de mon stage de Master 2. Il a nécessité un investissement conséquent lors du début de ma these pour la finalisation)

GENE COPY NUMBER VARIATION AND GENE EXPRESSION MODULATION IN A MULTIPARTITE VIRUS

Romain Gallet¹, Jérémy Di Mattia¹, Sébastien Ravel¹, Renaud Vitalis^{2,3}, Yannis Michalakis^{4#} and Stéphane Blanc^{1#*}

Affiliations

¹: PHIM, INRA, CIRAD, SupAgro, Univ Montpellier, Montpellier, France

²: CBGP, INRA, CIRAD, IRD, SupAgro, Univ Montpellier, Montpellier, France.

³: Institut de Biologie Computationnelle, Montpellier, France.

⁴: MIVEGEC, CNRS, IRD, Univ Montpellier, Montpellier, France

YM and SB equally contributed to this work

1. Abstract

Multipartite viruses have a segmented genome and each segment is encapsidated independently. Earlier studies reported that the distinct genome segments reproducibly accumulate at a specific and host-dependent relative frequency, defined as the 'genome formula'. It has been hypothesized that variations of the genome formula could affect gene expression via changes of the viral gene copy number. The multipartite virus model used in this work is a nanovirus, the faba bean necrotic stunt virus (FBNSV), composed of eight DNA genome segments each encoding a single gene. We initiated twenty parallel FBNSV lineages in faba bean plants, transferred them to medicago plants, and monitored both the relative concentrations of the DNA segments and those of the corresponding mRNAs in all lineages. Our analyses showed that the genome formula variations directly impact on gene expression. Moreover, when passaging FBNSV from one host species to the other, we observed that the relative abundance of the viral mRNAs were much more similar across hosts than the respective DNA formulas, suggesting that the genome formula adjusts gene expression to a changing environment. Deep-sequencing analysis of FBNSV lineages alternating from faba bean to medicago host plants demonstrated that the genome formula changes do not result

from DNA sequence mutations and could thus be viewed as “plastic” modifications. Together, our results indicate that the genome formula modulates gene expression of this multipartite virus in a changing environment in a DNA-sequence mutation-independent way.

2. Introduction

Like most organisms, viruses live in a heterogeneous environment. At the within-host level, they can be confronted to diverse cell types, physiological conditions, resistance mechanisms, and competitive interactions with other pathogens. At a higher level, they can be transmitted by vectors and experience host switching, increasing the diversity of the situations they have to cope with in order to be maintained and spread in the ecosystem.

Organisms respond to environmental heterogeneity through phenotypically plastic or genetically driven responses. Several phenotypically plastic responses of viruses have been documented (Clark & Wiktor 1974; Abedon 1999; Gallet *et al.* 2012; Leggett *et al.* 2013). However, the most commonly reported viral response to a changing environment is the selection of beneficial mutations in the genome sequence. Viral populations are characterized by large population sizes, short generation time and high mutation rates (at least for RNA viruses and single stranded DNA viruses (Sanjuan *et al.* 2010)). These features allow the production of numerous potentially adaptive variants that can become frequent and even be fixed very rapidly in the population, providing high evolutionary rates (Duffy *et al.* 2008). Such cases of adaptation are extremely numerous both in viruses of animals and plants, for example in the appearance of drug-resistant variants of HIV (Clutter *et al.* 2016) or HCV (Kim *et al.* 2016), and of resistance-breaking variants of plant viruses (Harrison 2002). Viral adaptation may also involve recombinants as many viral species also have a high recombination rate (Pérez-Losada *et al.* 2015). A notably different adaptation process, also related to the high mutation/recombination rate, relies on that viral populations develop as a “cloud” of mutants potentially cooperating with each other. This mutant cloud, sometimes called quasi-species (Andino & Domingo 2015), can have inherent properties that no single genotype can recapitulate and may be viewed as a unit of selection. Hence, adaptation could sometime stem from the selection of a defined ensemble of mutants. Vignuzzi *et al.* (2006) first demonstrated this possibility by showing that only a diverse poliovirus population could efficiently cross the blood/brain barrier, while each of the individual variants composing this population could not. With the emergence of next generation sequencing there are more and more reports of viral populations experiencing a change in their genetic composition (for a review see (Andino & Domingo 2015)) in distinct organs or tissues of the host (e.g. (Paranjpe *et al.* 2002; Grubaugh *et al.* 2016; Lequime *et al.* 2016)) or in different hosts (Grubaugh *et al.* 2015; Sánchez-Campos *et al.* 2018). Finally,

viruses, such as bacteriophage T4 (Wu & Black 1987) or the vaccinia virus (VACV, (Slabaugh *et al.* 1988)), were shown to adapt to specific environmental conditions by gene amplification. When the selection pressure favoring gene amplification was relaxed, the copy number of relevant genes was decreased (Wu *et al.* 1991; Elde *et al.* 2012), leading to a phenomenon termed “genomic accordion” ((Elde *et al.* 2012); see (Bayer *et al.* 2018) for a review). The genomic accordion strategy illustrates the dynamic aspect of some viral genomes, and more specifically the fact that modifying the gene copy number (GCN) can be immediately adaptive. An interesting report on Influenza A virus demonstrated that a mutation on the genome segment NP reduced the frequency of another genome segment NA in the population of virions, which in turn resulted in diminished accumulation of the encoded NA protein (Brooke *et al.* 2014). Thus, in this case a change in the relative copy number of the IAV genome segments, thus a gene copy number variation, affects gene expression and these changes are driven by mutations in the nucleic acid sequence.

It is generally believed that GCN changes are hampered in most viruses where genome size variation is limited by packaging constraints (Bayer *et al.* 2018). This argument not only apply to monopartite viruses but also to segmented viruses, which in principle encapsidate one copy of every genome segment in each virus particle. However, the study cited above on IAV demonstrated that there can be exceptions to this rule and that, in this example, rare segments can be missing in a large proportion of the produced virions. Therefore the packaging constraint may not totally eliminate the possibility of GCN variation in populations of some segmented viruses. Remarkably, this question is not relevant for multipartite viruses, which encapsidate each segment independently in an individual viral particle, and for which the variation of segment copy number does not affect encapsidation but the genetic composition of the viral particle populations.

Nanoviruses are multipartite plant viruses with eight genome segments, each encoding a single gene and encapsidated individually. In an earlier study, we showed that the various genome segments of the faba bean necrotic stunt virus (FBNSV, Genus *Nanovirus*, Family *Nanoviridae*) reproducibly accumulate at different and specific copy numbers in the host plant (Sicard *et al.* 2013). The resulting pattern of the relative frequency of the segments has been defined as the ‘genome formula’. This study also demonstrated that the FBNSV genome formula is significantly different in faba bean (*Vicia faba*) and in medicago (*Medicago truncatula*), as well as in aphid vectors (Sicard *et al.* 2015), illustrating a variation of the segments copy number in distinct host species. Since the discovery of the genome formula in FBNSV, additional reports on plant (Wu *et al.* 2017) and insect (Hu *et al.* 2016) viruses have revealed a similar phenomenon, indicating that it is likely a common feature of

multipartite viruses. Nevertheless, the how and why of the genome formula and its variation remain enigmatic. In particular, it is unclear whether (i) the genome formula variations (and thus the modification of the GCN) impact viral gene expression; and (ii) whether host-dependent genome formula variations are driven by DNA sequence mutations.

Here, we investigate these questions using the FBNSV as a model system. First, in order to know whether GCN variation affects gene expression, we concomitantly determined and compared the genome formula and the relative proportion of the eight viral mRNAs in several plant replicates of two different host species: faba bean and medicago. Then, to investigate whether DNA sequence mutations are responsible for the host-dependent genome formula shift, we analyzed deep-sequencing data from 20 independent FBNSV populations passing from faba bean to medicago plants. Our results indicate that the genome formula modulates viral gene expression and that these changes do not involve mutations in the DNA sequence of the genome segments.

3. Materials and Methods

a. Viral strain and plant infection procedures

In all experiments, we used the FBNSV isolate JKI-2000 provided by the Gronenborn lab and described in (Grigoras *et al.* 2009). Faba bean (*Vicia faba*, cv “Seville”) plants were agroinoculated with cultures of *Agrobacterium tumefaciens* COR308 strains, each carrying a pbin19 plasmid containing a tandem repeat of one of the 8 FBNSV segments. All 8 *A. tumefaciens* cultures were mixed together at equal proportions and inoculated into plants as described in (Sicard *et al.* 2013). When necessary, faba bean could also be infected via aphid transmission. Medicago (*Medicago truncatula*) plants however, were always infected via aphid transmission. We have previously shown that the same setpoint genome formula is reached whether plants are infected through agroinoculation or aphid transmission (Sicard *et al.* 2013).

b. Experiment 1

Overview: Concomitant quantification of viral DNAs and mRNAs

The setpoint genome formula was characterized as the average relative frequency of each segment across several plant replicates. The idea of this experiment was to embrace the across-replicate variation in the relative frequency of each segment in order to see whether it is translated into across-replicate variation in the relative frequency of the corresponding

mRNAs. We thus estimated the relative concentrations of both viral DNA segments and viral mRNAs in each plant sample analyzed. For plant viruses, the viral gene expression is stopped at some point of the infection in fully infected tissues (Gutiérrez *et al.* 2015). Consequently, to ensure capturing the transient expression of mRNAs, we performed this experiment at two different time points. The first replicate (Trial A) was performed on 16 faba bean and 28 medicago plants. The infection of each of these plants with FBNSV was independent. Samples were collected at different dates, on the first day where the individual infected plants showed symptoms, *i.e.* 10 to 15 days post infection (dpi) for faba bean and 13 to 18 dpi for medicago. The second replicate (Trial B) was similarly performed on 21 faba bean and 20 medicago plants, but samples were collected at one single later date for each plant species, once all plants of the species expressed symptoms, *i.e.* 21 days post infection (dpi) for faba bean and 20 dpi for medicago.

Extraction of single stranded DNA and mRNA from each plant sample

On each infected plant, an apical leaflet was sampled. Approximately 100 mg of vegetal tissue was placed in a microtube containing two sterile glass beads, and frozen immediately in liquid nitrogen. Samples were homogenized mechanically using a mixer mill MM 301 (four cycles of 20 seconds at 30 Hz).

In order to extract nucleic acids, 900 μ L of GHLC buffer (6.5 M guanidinium hydrochloride, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM sodium acetate pH 5.5, 0.1 M β -mercaptoethanol) were added to the homogenized samples. Tubes were vortexed and then centrifuged at 10 000g for 10 minutes at 4°C in a 5415R Eppendorf (Hamburg, Germany) centrifuge. Nine hundred microliters of TRI Reagent (Sigma-Aldrich) warmed at 65°C were added to supernatants. Tubes were vortexed gently over three cycles of 30 seconds, and 200 μ L of chloroform were added. After vortexing, samples were incubated for ten minutes at room temperature, and centrifuged at 12 000g for 15 minutes at 4°C. For each sample, 1200 μ L of aqueous upper phase containing nucleic acids were retrieved and divided in two tubes each containing 600 μ L. These 600 μ L were mixed with 560 μ L of cold (-20°C) isopropanol and centrifuged at 12 000g for 20 minutes at 4°C. Supernatants were discarded and pellets washed with 70% ethanol at 4°C. Finally, nucleic acids were resuspended in 50 μ L RNase free water, and the two tubes for each sample pooled back together to obtain 100 μ L of nucleic acid solution. This nucleic acid extraction step allowed retrieving both single stranded DNA and mRNA from the plant tissues.

Estimation of the DNA and RNA formulas by qPCR

Quantitative PCRs were directly performed on these nucleic acid samples in order to infer the FBNSV genome (DNA) formula. Inferring the viral RNA formula by qPCR was more tedious as it first required complete removal of the viral DNA and then reverse transcription of the mRNAs into cDNA.

Total elimination of the viral DNA could be achieved by using two treatments, a DNase I digestion followed by the purification of mRNAs. The DNase digestion was conducted by mixing 16 μL of nucleic acid sample with 2 μL of 10X DNase buffer (400mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM MgSO_4 and 10 mM CaCl_2) and 2 μL of DNase I (Promega). This mix was incubated at 37°C for 30 minutes. A subsequent 10 minutes incubation at 65°C inactivated the DNase. After digestion, the Dynabeads mRNA purification kit (Ambion - ThermoFisher) was used on the nucleic acid samples following the manufacturer's recommendations. Control qPCRs were performed on these samples and confirmed the complete degradation/elimination of viral DNA (Figure S1).

For production of the cDNAs, 10 μL of mRNA samples were mixed with 1 μL dNTP [10 mM] incubated for 5 minutes at 65°C and later placed on ice. A mix composed of 4 μL of 5x buffer (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl and 15 mM MgCl_2), 2 μL of DTT [100 mM] and 40 units of RNasin ribonuclease inhibitor (Promega) was added to the mRNA sample and incubated for 2 minutes at 42°C. Two hundred units of SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RT) (Invitrogen) were added to the mix, followed by an additional 50 minutes incubation at 42°C. The RT was inactivated with a final 15 minutes incubation at 70°C. The newly formed cDNAs were diluted 10 times so that the buffer does not affect the following qPCR reactions.

All qPCR reactions (40 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 10 s and 72°C for 10 s) were carried out using a LightCycler 480 thermocycler (Roche) and the LightCycler FastStart DNA Master Plus SYBR green I kit (Roche), following the manufacturer's instructions. The nucleic acid sample (1.2 μL of a 10-fold dilution of either total nucleic acid extracts or cDNA preparation) was added to the qPCR mix (5 μL of Roche 2x qPCR mastermix, 3.5 μL of H_2O , 0.3 μL of primer mix, 8.8 μL total) after distribution in 384-well microtiter plates. Primers (Sicard *et al.* 2013) were used at a final concentration of 0.3 μM for amplifications of the C, M, S segments and 0.5 μM for amplifications of the N, R, U1, U2, U4 segments.

Serial dilutions of plitmus28 plasmids each carrying one of the eight FBNSV segment (Grigoras *et al.* 2009) were placed on each qPCR plate (8 serial dilutions per PCR plate in

total, one for each FBNSV segment). These were used as an internal control in order to draw a standard curve for each segment and for each qPCR plate, alleviating any potential bias related to between-qPCR plate variations. Fluorescence data were first analyzed with the LinRegPCR program (Ruijter *et al.* 2009) and later converted into ng of DNA by using the standard curves. Both DNA and RNA formulas could then be inferred by computing the relative proportions of each segment or mRNA as described in (Sicard *et al.* 2013). All qPCR reactions were duplicated (two wells on the same PCR plate).

Statistical analyses

To investigate the relationship between gene expression and the concentration of DNA we calculated the Pearson correlations between the frequency of each segment and the frequency of its corresponding RNA in each host plant and trial. These results are reported in Figure 1 and Supplementary Table S1; we used the R software (version 3.1.3) to calculate them. Because of the large number of correlations and tests we applied the Benjamini-Hochberg False Discovery Rate (FDR) correction to the correlations across all segments for each host plant species and trial.

To study how the different factors (segment, host plant, DNA formula) interact, we modeled the concentration of mRNA of each segment as a function of the segment, the host plant and the concentration of DNA of the segment. Performing such analyses on relative frequencies of mRNA and DNA would provide intuitively interpretable results on intuitively normalized quantities: the frequencies. Unfortunately, such an analysis would be flawed by the fact that the frequencies of the DNA and mRNA of different segments within each replicate are not independent, since they sum to one; and because of this the regression coefficients linking them would also be correlated since their mean should also equal one. We thus opted for the following approach: (i) to investigate the interaction between the DNA formula and the host plant species we performed separate analyses on each segment, modeling the logit frequency of the segment's mRNA as a function of the host plant species, the logit of the frequency of the segment's DNA and their interaction; these analyses are reported in Supplementary Table S2; (ii) we run a full model on the concentrations, and not the frequencies, of the DNA and mRNA of each segment, because the quantities are not parametrically constrained. To comply with analysis of variance assumptions these quantities were first transformed by the Sb-Johnson distribution. The transformed values were analyzed in a mixed linear model whose dependent variable was the concentration of mRNA, and the explanatory variables were 'replicate', declared as a random factor, and 'segment', 'host plant' and 'concentration of DNA' declared as fixed variables (and all the double and triple interactions among the three fixed variables). This analysis is reported in

Supplementary Table S3. The analyses mentioned in this paragraph were performed using JMP 13.0.0 (SAS Institute 2016).

A distance between DNA formulas and between RNA formulas was calculated to compare the situation in faba bean and in medicago host plants. This distance between formulas was calculated as follows:

$$d = \sum |f_i^{faba} - f_i^{medicago}|$$

where f_i is the relative frequency of the i th segment in the formula.

All distances between DNA formulas in faba bean and in medicago and between RNA formulas in faba bean and in medicago were calculated (16 x 28 = 448 distances between DNA formulas and 448 distances between RNA formulas in Trial A; 21 x 20 = 420 distances between DNA formulas and 420 distances between RNA formulas in Trial B). As the formula of each plant was used several times to calculate all possible distances (e.g. the genomic formula of the faba bean plant 1 was used 28 times to calculate all distances between this formula and all medicago formulas), not all distances in the dataset are independent. In order to take this pseudo-replication into account, we analyzed these distances with a mixed model with the factor “faba bean plant identity” and “medicago plant identity” as random factors and the “nucleic acid” (DNA vs. mRNA) and time (Trial A vs. Trial B) as fixed effect factors. This statistical analysis was performed with JMP 13.0.0 (SAS Institute 2016).

c. Experiment 2

Overview: Monitoring viral polymorphism in populations passing from faba bean to medicago

This experiment has been described in a previous technical paper estimating the various possible quantitative biases during amplification steps and ultra deep sequencing of these viral populations (Gallet *et al.* 2017). In the present study, the same experiment and thus the same deep sequencing dataset is used to monitor polymorphism in 20 independent viral populations passing from faba bean to medicago host plants.

Briefly, 15 aphids were placed on each of 20 FBNSV-infected faba bean plants, three weeks post-infection. Three days later, 10 of these aphids were used from each plant to transmit the FBNSV to a set of 20 medicago plants, thus creating 20 independent viral populations. During this experiment, total DNA extraction was performed on systemically infected faba

bean (21 days post infection, just before aphids were placed on the plants) and medicago plants (26 days post inoculation by the aphids). qPCR were first performed on all 40 DNA extracts in order to measure the FBNSV genome formula in the two host species. Then, a rolling circle amplification (RCA, amplifying single stranded circular FBNSV DNA segments) was performed in order to enrich the samples with viral DNA sequences, and the 40 RCA products were sent for deep sequencing (for full details see (Gallet *et al.* 2017)). The full sequence data set is available upon request.

Candidate mutations for genome formula variation

To be considered a mutation impacting the FBNSV genome formula when the virus is passaged from faba bean to medicago, the mutation should (i) show a significant increase in frequency between faba bean and medicago samples, beyond that expected under drift alone; (ii) this change in frequency should be consistent across replicates; and (iii) this increase should correlate with the variation in the genome formula. We describe below how mutations under selection have been searched for. The other two requirements, repeated occurrence in parallel viral populations and correlation with genome formula changes, are reported in the Results section.

In order to identify mutations whose frequency changed between faba bean and medicago samples beyond what is expected under drift alone, we tested for the homogeneity of temporal differentiation across nucleotide sites for each viral population passaged from faba bean to medicago, using a procedure inspired by Goldringer and Bataillon (2004) and detailed in Frachon *et al.* (2017). At each of the 7907 positions composing the FBNSV genome, we reported the observed number of A, T, C and G provided by the NGS data analysis, and thus calculated the frequency of each base ($f(A)$, $f(T)$, $f(C)$, $f(G)$) at each position. We did so for all forty FBNSV populations (20 in faba bean, 20 in medicago). The rationale of such an analysis is that if all sites are selectively neutral, they should provide identically distributed estimates of temporal differentiation. However, if some sites are targeted by selection (or if they are in linkage disequilibrium with selected variants), then some heterogeneity in site-specific measures of temporal differentiation should be observed. To identify those sites that show outstanding differentiation compared to neutral expectation, we simulated the dynamics of nucleotide frequency change between the faba bean and the medicago samples, conditionally on the initial nucleotide counts in the faba bean sample and on the strength of genetic drift during the experiment (see below).

First, for each segment and for each replicate viral population (out of 20), we measured temporal differentiation between the faba bean and the medicago samples using a

multilocus measure of F_{ST} (Weir & Cockerham 1984), across all nucleotide sites within a segment. If we neglect new mutations occurring during the passage from faba bean to medicago, then the pairwise parameter F_{ST} between the two temporal samples equals:

$$F_{ST} \approx \frac{\tau}{\tau + 2N_e}$$

where N_e is the haploid effective size of the viral population, τ is the number of viral generations elapsed between the temporal samples (Skoglund *et al.* 2014). This suggests that a simple moment-based estimator of effective population size can be derived as:

$$\hat{N}_e = \frac{\tau(1 - \hat{F}_{ST})}{2\hat{F}_{ST}}$$

where \hat{F}_{ST} is a multilocus estimate of the parameter F_{ST} .

Second, for each nucleotide site, we tested the null hypothesis that the locus-specific differentiation measured at this focal marker was only due to genetic drift. For this purpose, we computed the expected distribution of F_{ST} at each site, conditional upon the estimated effective population size for the segment, and the allele frequencies at the focal site in the faba bean sample. We simulated individual nucleotide frequency trajectories, as follows: suppose that we observe a vector $\mathbf{y} = (y_A, y_C, y_G, y_T)$ of nucleotide counts, out of $n = y_A + y_C + y_G + y_T$ total counts, in the faba bean sample. We assume that these observed counts are drawn from a multinomial distribution $M(n, \mathbf{x})$ where $\mathbf{x} = (x_A, x_C, x_G, x_T)$ is the vector of (unknown) nucleotide frequencies in the faba bean population. Assuming a Dirichlet $\text{Dir}(\mathbf{1})$ uniform prior distribution for \mathbf{x} , and using the Bayes inversion formula, the posterior distribution of \mathbf{x} is distributed as $\text{Dir}(\mathbf{y} + \mathbf{1})$. For each nucleotide site and for each simulation, we therefore draw the initial allele frequencies in the faba bean sample $\boldsymbol{\pi}_{fb} = (\pi_A, \pi_C, \pi_G, \pi_T)$, at random, from a $\text{Dir}(\mathbf{y} + \mathbf{1})$ distribution. We then draw “pseudo-observed” allele counts using a random draw from $M(n, \boldsymbol{\pi}_{fb})$. This procedure allows accounting for the sampling variance in initial allele frequencies. Then, we simulate τ generations of drift, using successive multinomial draws with parameters \hat{N}_e (the segment-specific estimate of the virus effective population size) and the nucleotide frequencies in the previous generation. In the last generation, a sample of nucleotide counts is drawn from a multinomial distribution with index n_M (the total number of nucleotides observed in the medicago sample) and $\boldsymbol{\pi}_\tau$ (the simulated nucleotide frequencies in the last generation). Last, we compute site-specific estimates of temporal F_{ST} from the simulated nucleotide counts at the initial and last generation. The whole procedure is repeated at least 100,000 times for each of the 7907

sites composing the FBNSV genome. Finally, we assign a p -value to each site, computed as the proportion of simulations giving a site-specific estimate of F_{ST} larger than or equal to the observed value at the focal nucleotide site. Note that all sites with a maximum nucleotide frequency larger than 0.999 (computed as the overall frequency across the faba bean and the medicago samples) were considered as not polymorphic and thus discarded from the analysis. To avoid any potential bias, the same rule was applied for the simulations.

4. Results

a. Gene copy number affects gene expression in FBNSV

In order to investigate whether the FBNSV gene expression is affected by GCN, we assessed whether variation of the relative concentration of the viral mRNA produced by each segment across different individual plants of a given host species could be explained by variation of the genome formula across these same individual plants (Experiment 1 described in Materials and Methods). In each plant sample analyzed, we thus estimated the relative concentrations of both viral DNA segments and viral mRNAs, that we hereafter respectively designate DNA formula and RNA formula. It has been shown in various biological systems that the viral gene expression is stopped at some point of the infection (Gutiérrez *et al.* 2015). To ensure capturing the transient expression of mRNAs, we performed this experiment at two different time points: in Trial A, as soon as infection symptoms were visible on each individual plant, and in Trial B, at the same time post-infection for all individual plants once all had exhibited symptoms. Because an mRNA half-life can be short we were aware that the two trials could differ in their capacity to potentially capture a correlation between the DNA and mRNA formulas. Figure 1 (and Table S1) shows that the relative frequency of each of the eight mRNAs of the FBNSV is positively correlated to that of its encoding segment in Trial A, both in faba bean and in medicago host plants (except for the S segment in faba bean for which the correlation is not significant). Trial B provided consistent observations, with six and four segments, respectively on faba bean and medicago, showing significant positive relationships (Figure S2 and Table S1). The segment-by-segment analyses identified statistically significant effects of either the DNA formula or its interaction with the host plant species for all segments in Trial A and for six segments in trial B (Table S2), further indicating that a change in a segment frequency and thus of the genome formula induces a change of the gene expression.

The slopes of the linear regressions between mRNA and DNA relative frequencies vary with both the segments and the host species (Figure 1). To assess the statistical significance of this slope variation across hosts we analyzed the plant species effect on the DNA/mRNA

correlation for each segment separately. A statistically significant effect was observed for segments C, R and U1 in both trials and for segment M in Trial A (Table S2), indicating that these segments are differentially expressed in the two host plant species. The slope variation across segments is further supported by the statistically significant segment-by-plant interaction in the full model using mRNA and DNA concentrations (Table S3).

b. Different genome formulas in faba Bean and medicago produce similar mRNA formulas

As indicated above, the relative frequencies of the eight FBNSV segments and of the 8 corresponding mRNAs are respectively referred to as the DNA and RNA formulas. We plotted and compared these DNA and RNA formulas when estimated from faba bean and from medicago plants (Figure 2 for Trial A, Figure S3 for trial B). As already observed in a previous study (Sicard *et al.* 2013), the FBNSV DNA formulas in faba bean and medicago are clearly distinct. However, the RNA formulas observed in the two host species appear more similar. In order to formally confirm that the RNA formulas observed in faba bean and in medicago are more alike than the DNA formulas, we compared the distance between DNA formulas and between RNA formulas (see Materials and Methods). Our statistical analysis showed that the distance between faba bean and medicago RNA formulas was significantly smaller than the distance between faba bean and medicago DNA formulas in both trials (Table 1 for trial A and Table S4 for trial B). These results demonstrate that while the DNA formula changes drastically when FBNSV switches from faba bean to medicago, the relative proportions (or stoichiometry) of the eight mRNAs tend to be conserved.

c. Looking for adaptive mutations in the FBNSV sequence

To investigate whether the change in genome formula when FBNSV switches hosts is due, or not, to selection of mutations in the sequence of one or several segments, we re-analyzed deep-sequencing data from 20 independent FBNSV populations passed from faba bean to medicago (Experiment 2 described in Materials and Methods). Figure S4 shows that, just like in Experiment 1 and in earlier reports (Sicard *et al.* 2013; Gallet *et al.* 2017), the FBNSV genome formula was clearly different in faba bean and medicago, confirming that the expected host-dependent genome formula shift has occurred.

The modification of a phenotype during viral infection could either have a genetically determined basis or be due to a plastic response. Thus, we aimed at identifying mutations showing outstanding differentiation between faba bean and medicago samples (as compared to what is expected under genetic drift alone) that could be interpreted as evidence of selection and whose frequency variation across host species could explain the DNA formula variation. This statistical approach is fully detailed in the Materials and Methods section.

At any of the 7907 nucleotide positions in the FBNSV genome, over the 20 replicated viral populations monitored in faba bean and medicago samples, we observed more differentiation than expected under neutrality ($p \leq 0.01$) in only 880 cases at 740 different positions. Because the generation time is not known for FBNSV, we estimated the number of positions showing more differentiation than expected under neutrality considering 1, 10 or 100 viral generations between the faba bean and the medicago samples, and obtained the same results.

Out of the 880 cases where differentiation above that expected from drift alone was detected, only eight mutations were observed in parallel in at least four independent populations: two sites (positions 1803 and 3393) were significantly more differentiated than expected under neutrality in four replicate populations, two sites (positions 881 and 2775) in five replicate populations, three sites (1718, 5576 and 6974) in six replicate populations, and one site (6978) in seven replicate populations. Table 2 shows that none of the corresponding mutations consistently increased in frequency; they either increased or decreased across replicates (also see Figure S5). Nevertheless, we tested whether the frequency variations (observed between faba bean and medicago samples) of each of the eight candidate mutations were correlated to segment frequency variations. Over the 64 tested correlations (8 candidate mutations x 8 segments) we found no statistically significant relationship before or after Holm's correction for multiple testing (Figure S6). Therefore, we conclude that the eight sites identified as showing higher differentiation than expected under drift in our experiment and bearing mutations with the highest levels of parallelism cannot explain the variations of FBNSV genome formula observed when switching from faba bean to medicago.

5. Discussion

The discovery of the genome formula of FBNSV (Sicard *et al.* 2013) has changed the perception of the scientific community on multipartite or even segmented viruses

(Diefenbacher *et al.* 2018). Subsequent studies performed on other multipartite viruses have shown that the various segments composing the genome also accumulate at different frequencies in the infected hosts (Hu *et al.* 2016; Wu *et al.* 2017). While this phenomenon appears general, the mechanisms leading to the establishment of the genome formula as well as its actual function remain a mystery. We earlier hypothesized (Sicard *et al.* 2013) that the multipartite genome architecture of FBNSV would allow the adjustment of gene expression by the modulation of the GCN. Such a modulation system would require (i) a correlation between GCN and gene expression - *i.e.* a correlation between the relative segment frequencies and those of their respective mRNA - and (ii) the ability to adjust the GCN when the viral gene expression is affected by environmental conditions.

Regarding the first point, our results clearly show that mRNA productions are positively correlated with the abundance of their corresponding segments. This observation was verified in both faba bean and medicago. In the 'early' Trial A, the only segment that did not show a statistically significant correlation was segment S in the faba bean background (*i.e.* one non-significant correlation out of 16 – Figure 1 and Table S1). This is probably due to the relative scarcity of this segment in the faba bean DNA formula, which leads to overall low relative frequencies of both S mRNA and DNA, and consequently low variances. In trial B, the infection was at a later stage when compared to trial A and this could explain that correlations between segments and their corresponding mRNA were not significant in 6 instances out of 16. We anticipated a possible distinct turnover for DNA segments and for their cognate mRNAs in infected cells, which might bias the assessment of their correlated accumulation at some stages of the infection. It is notable that most plant viruses stop expressing their genes in infected tissues after some time (e.g. (Gutiérrez *et al.* 2015)). We performed Trials A and B at different infection times to increase our chances to accurately capture the transient mRNA expression at least in one of the trials. While trial A was harvested as early as possible, when the virus just colonized the young tissues, Trial B was harvested later, once the infection was fully established, with the risk of harvesting tissues when the transcription of viral genes is no longer "active". If so, mRNA are likely rapidly degraded whereas the viral DNA is more stably stored within the nucleus as minichromosomes or mature virions, possibly biasing the analyzed correlations. Despite this potential drawback for trial B, the DNA segment frequencies proved to significantly impact the mRNA production in most cases.

The fact that different segments had different levels of mRNA production may simply reflect a different efficiency of the segments' respective promoter or different mRNA half-lives. Interestingly, the mRNA production could also vary for a given segment between the faba

bean and medicago backgrounds, similarly indicating that its promoter may not be equally compatible with the host plant species respective transcriptional machinery or that the stability of mRNA may vary. Considering that the FBNSV genome (DNA) formula is different and modulates the expression of the viral mRNAs in the two host plant species, and that a given segment do not produce the same amount of mRNA in these two environments, one intuitively expects the relative proportion of the distinct viral mRNAs (RNA formula) to also greatly vary, at least reflecting differences observed at the DNA level and perhaps even more. Surprisingly, however, our results indicate that the RNA formula tends to be conserved in the two hosts, indicating that the DNA formula changes can compensate for the distinct mRNA-production capacity of the segments in these two distinct environments and maintain a rather steady mRNA stoichiometry.

The characterization of the genome formula (Sicard *et al.* 2013) immediately revealed a conceptual problem on what exactly constitutes the genome of multipartite viruses: should it be just the set of the sequences of their segments or should a definition of their genome also include the number of copies of each segment? Our results show that the genome formula modification accompanying the change of host plant species is not due to the modification of the frequency of specific variants of their DNA sequence. In this respect, the genome formula shift accompanying a host switch could be viewed as an indication of viral phenotypic plasticity. The situation is, however, unclear: the genome formula shift is in essence a modification of the copy number of specific genes. In this respect, it is not conceptually different from the 'genomic accordion' process (Elde *et al.* 2012; Bayer *et al.* 2018) that illustrates a way through which monopartite viruses respond to environmental changes by modifying the number of copies of specific genes of their genome. In the case of the monopartite viruses it is obvious to everyone that the determinism of the phenotypic adaptation to the environmental challenge via "genomic accordions" is genetically based. The fact that the genes of multipartite viruses are carried by separate segments offers them great flexibility in the number of copies. This flexibility muddles our conceptual characterizations: because we have difficulty in defining what their genome really is, we have difficulty in deciding on the nature of their responses to environmental changes. Is it genetic, plastic, epigenetic? The multipartite viruses, at least FBNSV, do not care. To cope with their host heterogeneity they modify their segment stoichiometry without changing their nucleic acid sequences, and this in turn modulates their genes' expression.

6. References

- Abedon, S.T. (1999). Bacteriophage T4 resistance to lysis-inhibition collapse. *Genet. Res.* **74**: 1–11.
- Andino, R. & Domingo, E. (2015). Viral quasispecies. *Virology* **479–480**: 46–51.
- Bayer, A., Brennan, G. & Geballe, A.P. (2018). Adaptation by copy number variation in monopartite viruses. *Curr. Opin. Virol.* **33**: 7–12.
- Brooke, C.B., Ince, W.L., Wei, J., Bennink, J.R. & Yewdell, J.W. (2014). Influenza A virus nucleoprotein selectively decreases neuraminidase gene-segment packaging while enhancing viral fitness and transmissibility. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 16854–16859.
- Clark, H.F. & Wiktor, T.J. (1974). Plasticity of phenotypic characters of rabies related viruses: spontaneous variation in the plaque morphology, virulence, and temperature sensitivity characters of serially propagated Lagos bat and Mokola viruses. *J. Infect. Dis.* **130**: 608–618.
- Clutter, D.S., Jordan, M.R., Bertagnolio, S. & Shafer, R.W. (2016). HIV-1 drug resistance and resistance testing. *Infect. Genet. Evol.* **46**: 292–307.
- Diefenbacher, M., Sun, J. & Brooke, C.B. (2018). The parts are greater than the whole: the role of semi-infectious particles in influenza A virus biology. *Curr. Opin. Virol.* **33**: 42–46.
- Duffy, S., Shackelton, L.A. & Holmes, E.C. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: Patterns and determinants. *Nat. Rev. Genet.* **9**: 267–276.
- Elde, N.C., Child, S.J., Eickbush, M.T., Kitzman, J.O., Rogers, K.S., Shendure, J., *et al.* (2012). Poxviruses deploy genomic accordions to adapt rapidly against host antiviral defenses. *Cell* **150**: 831–841.
- Frachon, L., Libourel, C., Villoutreix, R., Carrère, S., Glorieux, C., Huard-Chauveau, C., *et al.* (2017). Intermediate degrees of synergistic pleiotropy drive adaptive evolution in ecological time. *Nat. Ecol. Evol.*
- Gallet, R., Fabre, F., Michalakis, Y. & Blanc, S. (2017). The number of target molecules of the amplification step limits accuracy and sensitivity in ultradeep-sequencing viral population studies. *J. Virol.* **91**: e00561-17.
- Gallet, R., Lenormand, T. & Wang, I.N. (2012). Phenotypic stochasticity prevents lytic bacteriophage population from extinction during bacterial stationary phase. *Evolution (N. Y.)* **66**: 3485–3494.
- Goldringer, I. & Bataillon, T. (2004). On the distribution of temporal variations in allele frequency: Consequences for the estimation of effective population size and the detection of loci undergoing selection. *Genetics* **168**: 563–568.
- Grigoras, I., Timchenko, T., Katul, L., Grande-Pérez, A., Vetten, H.-J. & Gronenborn, B. (2009). Reconstitution of authentic nanovirus from multiple cloned DNAs. *J. Virol.* **83**: 10778–87.
- Grubaugh, N.D., Smith, D.R., Brackney, D.E., Bosco-Lauth, A.M., Fauver, J.R., Campbell, C.L., *et al.* (2015). Experimental Evolution of an RNA Virus in Wild Birds: Evidence for Host-Dependent Impacts on Population Structure and Competitive Fitness. *PLoS Pathog.* **11**: 1–19.
- Grubaugh, N.D., Weger-Lucarelli, J., Murrieta, R.A., Fauver, J.R., Garcia-Luna, S.M., Prasad, A.N., *et al.* (2016). Genetic Drift during Systemic Arbovirus Infection of Mosquito Vectors Leads to Decreased Relative Fitness during Host Switching. *Cell Host Microbe* **19**: 481–492.
- Gutiérrez, S., Pirolles, E., Yvon, M., Baecker, V., Michalakis, Y. & Blanc, S. (2015). The Multiplicity of Cellular Infection Changes Depending on the Route of Cell Infection in a Plant Virus. *J. Virol.* **89**: 9665–9675.

- Harrison, B.D. (2002). Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. *Euphytica* **124**: 181–192.
- Hu, Z., Zhang, X., Liu, W., Zhou, Q., Zhang, Q., Li, G., *et al.* (2016). Genome segments accumulate with different frequencies in *Bombyx mori* bidensovirus. *J. Basic Microbiol.* **56**: 1338–1343.
- Kim, S., Han, K.H. & Ahn, S.H. (2016). Hepatitis C virus and antiviral drug resistance. *Gut Liver* **10**: 890–895.
- Leggett, H.C., Benmayor, R., Hodgson, D.J. & Buckling, A. (2013). Experimental evolution of adaptive phenotypic plasticity in a parasite. *Curr. Biol.* **23**: 139–142.
- Lequime, S., Fontaine, A., Ar Gouilh, M., Moltini-Conclois, I. & Lambrechts, L. (2016). Genetic Drift, Purifying Selection and Vector Genotype Shape Dengue Virus Intra-host Genetic Diversity in Mosquitoes. *PLoS Genet.* **12**: 1–24.
- Paranjpe, S., Craigo, J., Patterson, B., Ding, M., Barroso, P., Harrison, L., *et al.* (2002). Subcompartmentalization of HIV-1 Quasispecies between Seminal Cells and Seminal Plasma Indicates Their Origin in Distinct Genital Tissues. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **18**: 1271–1280.
- Pérez-Losada, M., Arenas, M., Galán, J.C., Palero, F. & González-Candelas, F. (2015). Recombination in viruses: Mechanisms, methods of study, and evolutionary consequences. *Infect. Genet. Evol.* **30**: 296–307.
- Ruijter, J.M., Ramakers, C., Hoogaars, W.M.H., Karlen, Y., Bakker, O., Van Den Hoff, M.J.B., *et al.* (2009). Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res.* **37**: e45.
- Sánchez-Campos, S., Domínguez-Huerta, G., Díaz-Martínez, L., Tomás, D.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., *et al.* (2018). Differential Shape of Geminivirus Mutant Spectra Across Cultivated and Wild Hosts With Invariant Viral Consensus Sequences. *Front. Plant Sci.* **9**.
- Sanjuan, R., Nebot, M.R., Chirico, N., Mansky, L.M. & Belshaw, R. (2010). Viral Mutation Rates. *J. Virol.* **84**: 9733–9748.
- Sicard, A., Yvon, M., Timchenko, T., Gronenborn, B., Michalakis, Y., Gutierrez, S., *et al.* (2013). Gene copy number is differentially regulated in a multipartite virus. *Nat. Commun.* **4**: 2248.
- Sicard, A., Zeddou, J.-L., Yvon, M., Michalakis, Y., Gutiérrez, S. & Blanc, S. (2015). Circulative nonpropagative aphid transmission of Nanoviruses: an oversimplified view. *J. Virol.* **89**: 9719–26.
- Skoglund, P., Sjödin, P., Skoglund, T., Lascoux, M. & Jakobsson, M. (2014). Investigating population history using temporal genetic differentiation. *Mol. Biol. Evol.* **31**: 2516–2527.
- Slabaugh, M., Roseman, N., Davis, R. & Mathews, C. (1988). Vaccinia virus-encoded ribonucleotide reductase: sequence conservation of the gene for the small subunit and its amplification in hydroxyurea-resistant mutants. *J. Virol.* **62**: 519–527.
- Vignuzzi, M., Stone, J.K., Arnold, J.J., Cameron, C.E. & Andino, R. (2006). Quasispecies diversity determines pathogenesis through cooperative interactions in a viral population. *Nature* **439**: 344–8.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution (N. Y.)* **38**: 1358.
- Wu, B., Zwart, M.P., Sánchez-Navarro, J.A. & Elena, S.F. (2017). Within-host evolution of segments ratio for the tripartite genome of Alfalfa mosaic virus. *Sci. Rep.* **7**: 5004.
- Wu, D.G. & Black, L.W. (1987). Gene amplification mechanism for the hyperproduction of T4 bacteriophage gene 17 and 18 proteins. *J. Mol. Biol.* **195**: 769–783.
- Wu, D.G., Wu, C.H. & Black, L.W. (1991). Reiterated gene amplifications at specific short

homology sequences in phage T4 produce Hp17 mutants. *J. Mol. Biol.* **218**: 705–721.

7. Figure legends

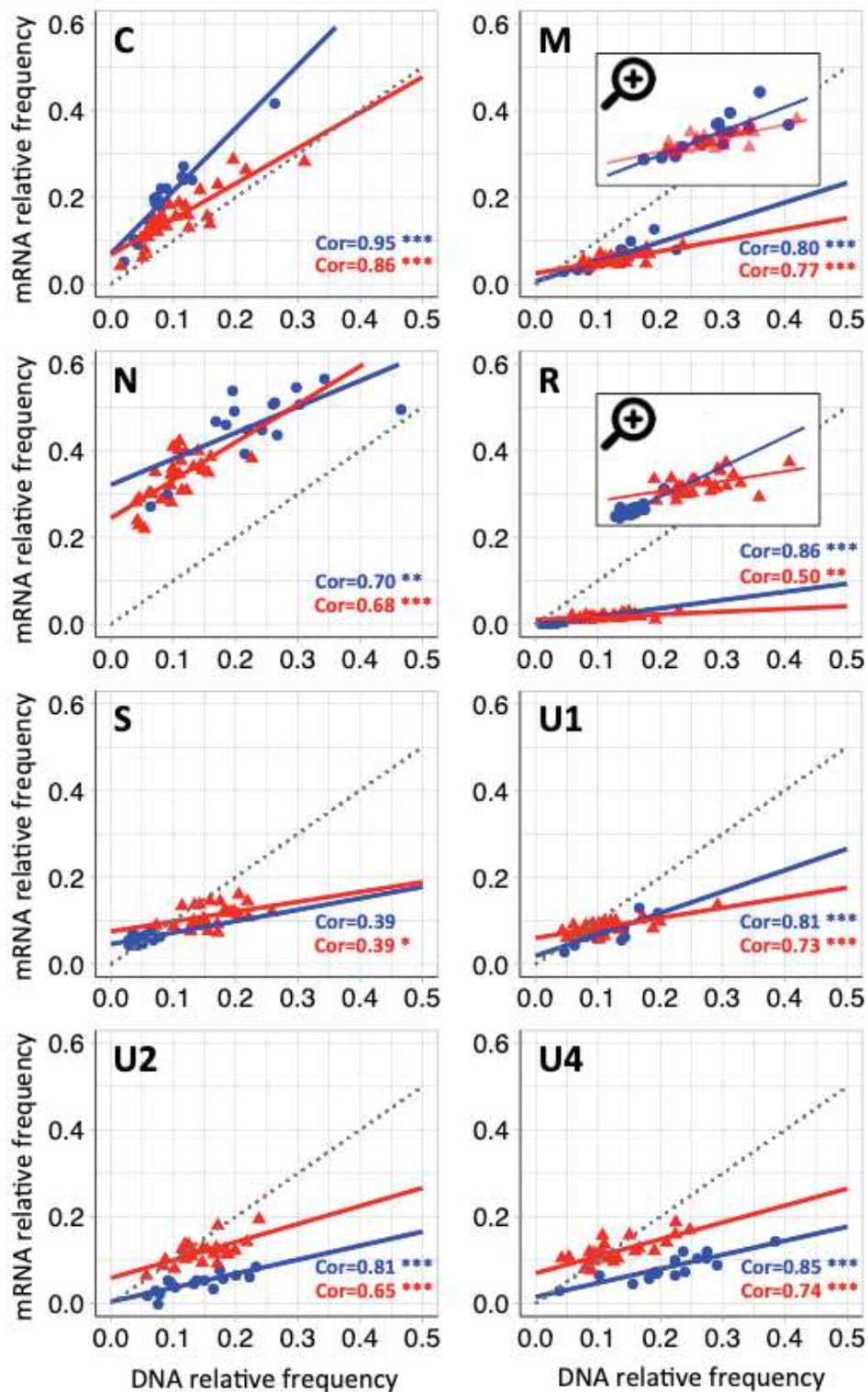


Figure 1: Correlations between the relative frequency of FBNSV genome segments and that of their respective mRNAs.

The data used here are those from Trial A, Experiment 1 (see Materials and Methods). Each panel shows the correlation between the relative frequency of a FBNSV segment and the relative frequency of the corresponding mRNA. Data points, linear regressions, correlation coefficients and p-values are shown in blue and red for FBNSV infecting faba bean and medicago respectively. '***', '**', and '*' correspond to p -value ≤ 0.001 , 0.01 , 0.05 , respectively. The dotted line illustrates a slope of 1.

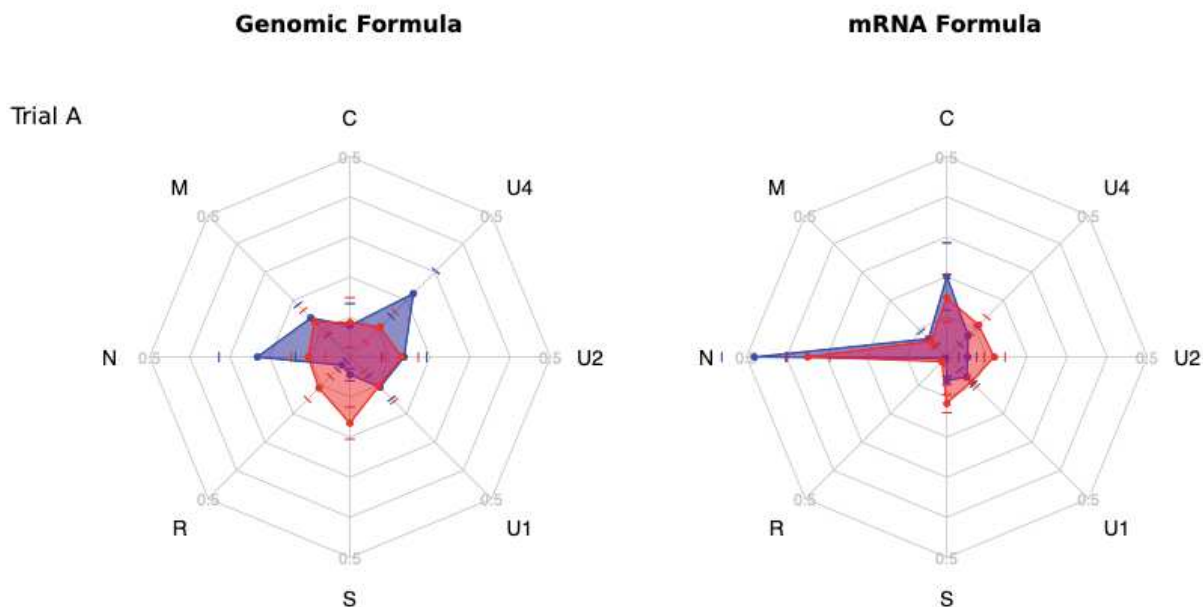


Figure 2: Radar plot of FBNSV DNA and RNA formulas in trial A (Experiment 1).

The median relative frequencies of each FBNSV segments (left) or of their corresponding transcripts (right) are represented on one of the eight axes composing the radar plot (formulas calculated from the 16 faba bean and 28 medicago plants in trial A). The FBNSV formulas observed in faba bean and medicago are represented in blue and red respectively. Standard deviations are represented by colored bars. The distances between the RNA formulas observed in faba bean and medicago are significantly smaller than those between the corresponding DNA formulas (Table 1).

Table 1: Statistical analysis of the distance between DNA and between mRNA formulas in faba bean and medicago (Experiment 1, Trial A).

The nature of the nucleic acid (acnuc), DNA or mRNA, was a fixed factor. We used the individual plant, faba bean or medicago, and its interaction with the nucleic acid as random factors to account for pseudoreplication. See main text for more explanations.

Model adjusted $R^2 = 0.8351$

Fixed Effect Tests

Source	Nparm ^a	DF ^b	DFDen ^c	F Ratio	Prob > F	
acnuc	1	1	38.59	48.1650	<.0001	***

^a: number of parameter, ^b: degrees of freedom, ^c: denominator degrees of freedom

REML Variance Component Estimates

Random effect	Variance component	Std Error	95% lower	95% upper	Wald p-value	% of total
faba	0.0017	0.0014	-0.0011	0.0044	0.2334	9.416
medic	0.0004	0.0015	-0.0026	0.0034	0.7895	2.291
acnuc*faba	0.0033	0.0013	0.0008	0.0058	0.0095	18.657

acnuc*medic	0.0072	0.0020	0.0032	0.0112	0.0004	40.424
Residual	0.0052	0.0006	0.0048	0.0057		29.211
Total	0.0177	0.0021	0.0143	0.0226		100.000

Table 2: Positions showing higher differentiation than expected by chance in at least 4 out of the 20 replicate populations (Experiment 2).

position	Segment	Position in the segment	Position in the genome	Replicate populations																			
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
881	C	881	881							A ↘					T ↘	T ↘				T ↗		G ↗	
1718	M	724	1718							A ↘										C ↗	C ↘	G ↗	
1803	M	809	1803											C ↘	C ↗	C ↗						C ↗	
2775	N	801	2775							A ↘	A ↗	A ↘					A ↗					A ↘	
3393	R	438	3393	G ↗		G ↗									G ↘					G ↘			
5576	U1	626	5576																		C ↗	C ↘	
6974	U4	54	6974							G ↘	G ↗									G ↘			
6978	U4	58	6978							A ↘	A ↘									A ↘			

For each of the eight candidate mutations, we identify the populations in which outstanding frequency variation between hosts was detected with a colored box. The letter in the box shows the nucleotide with the highest F_{ST} , while the color of the box and the arrow indicate whether the frequency of the nucleotide increases or decreases in the population. For more detailed information (amplitude of frequency variations etc.) see Figure S5.

8. Supplementary information

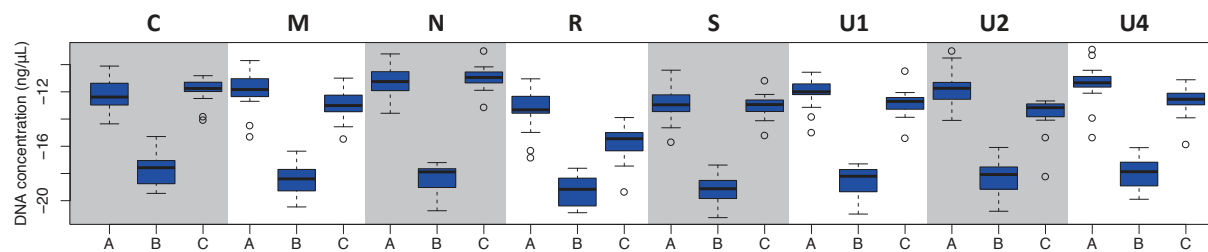


Figure S1: Specific quantification of FBNSV DNAs and mRNAs in infected plant tissues.

Infected faba bean plants in Trial A were used to ascertain the accuracy of our quantification of genome segments versus viral mRNAs. Genome segments were detected by qPCR before DNase treatment (A), after DNase treatment (B), and finally after reverse transcription of mRNA into cDNA (C). The figure shows that the DNase treatment reduced the DNA concentration by more than 4 orders of magnitude (down to the level of negative control). The reverse transcription efficiently converted mRNA into cDNA. Would some initial viral genomic DNA remain after DNase treatment and mRNA purification, it could only represent less than 0.1% of the cDNA, not significantly affecting the mRNA quantification.

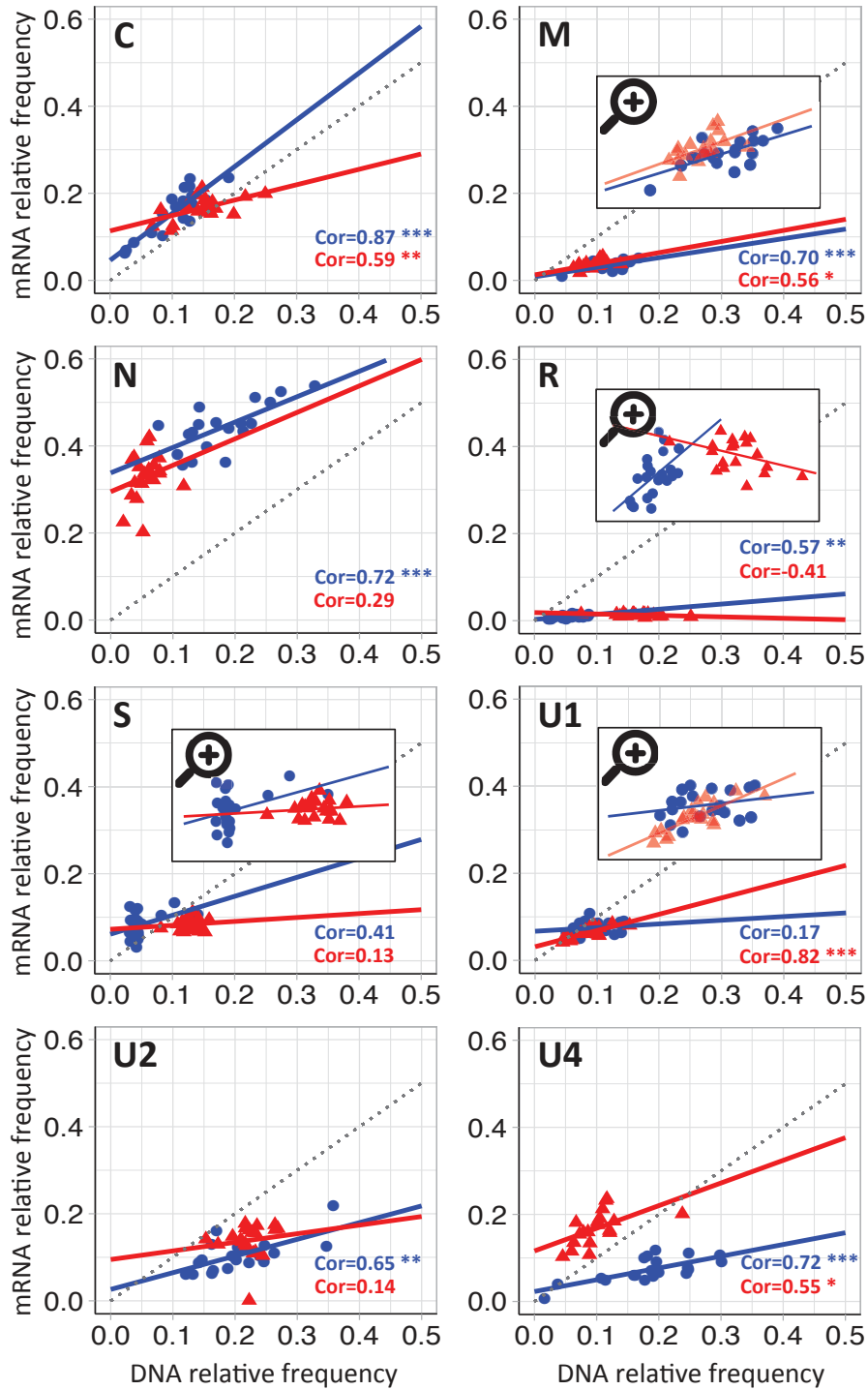


Figure S2: Correlations between the relative frequency of FBNSV genome segments and that of their respective mRNAs in Trial B of Experiment 1.

Each panel shows the correlation between the relative frequency of a FBNSV segment and the relative frequency of the corresponding mRNA. Data points, linear regressions, correlation coefficients and p-values are shown in blue and red for FBNSV infecting faba bean and medicago respectively. '***', '**', and '*' correspond to p -value ≤ 0.001 , 0.01 , and 0.05 , respectively. The dotted line illustrates a slope of 1.

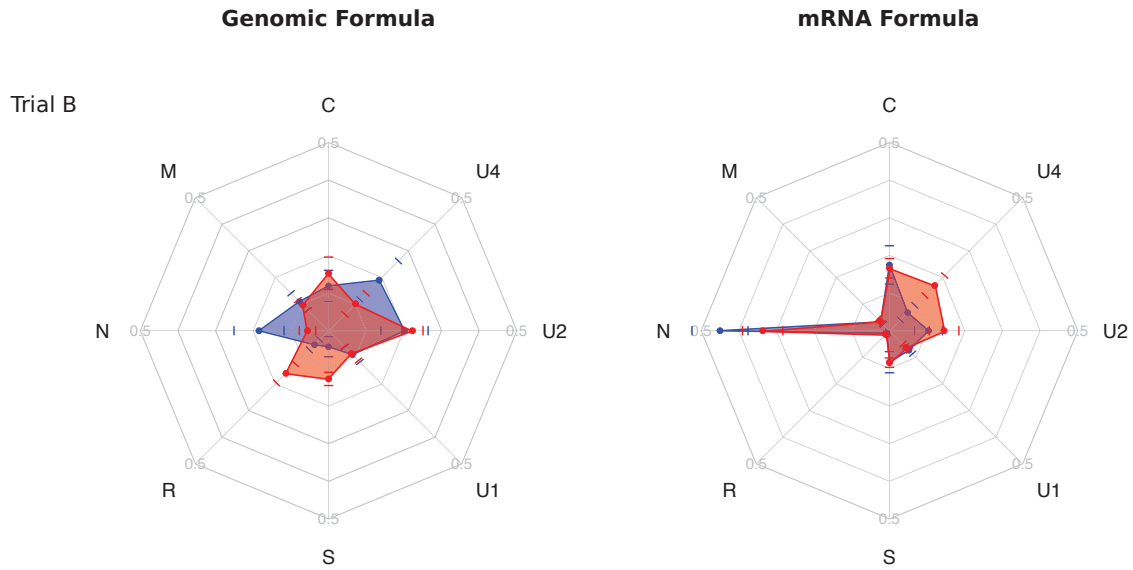


Figure S3: Radar plot of FBNSV genomic and mRNA formulas in trial B.

The average relative frequencies of each FBNSV segments (plot on the left) or of their corresponding transcripts (plot on the right) are represented on one of the eight axes composing the radar plot (formulas calculated from the 21 faba bean and 20 medicago in trial B). The FBNSV formulas observed in faba bean and medicago are represented in blue and red respectively. Standard deviations are represented by colored bars. The distances between the RNA formulas observed in faba bean and medicago are significantly smaller than the distances between the DNA formulas (Table S4).

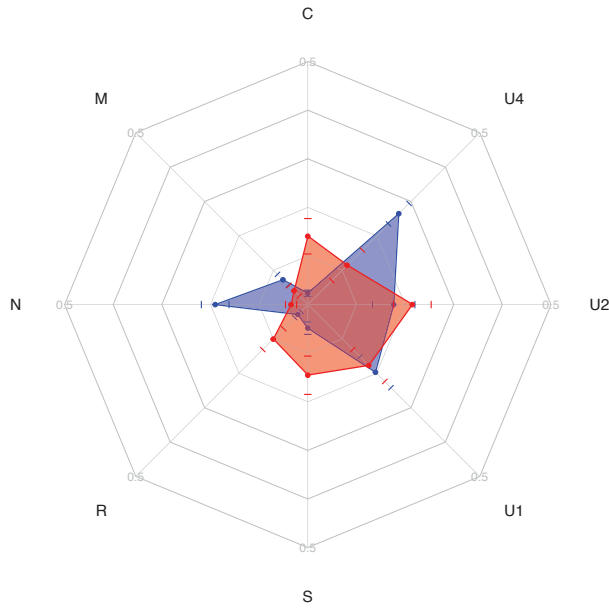


Figure S4: Radar plot of FBNSV genome formula in faba bean and medicago.

The median relative frequency of each FBNSV segment is represented on one of the eight axes composing the radar plot (formulas calculated from the 20 faba bean and 20 medicago plants from Experiment 2). The FBNSV genome formulas observed in faba bean and medicago are represented in blue and red respectively. Standard deviations are represented by colored bars.

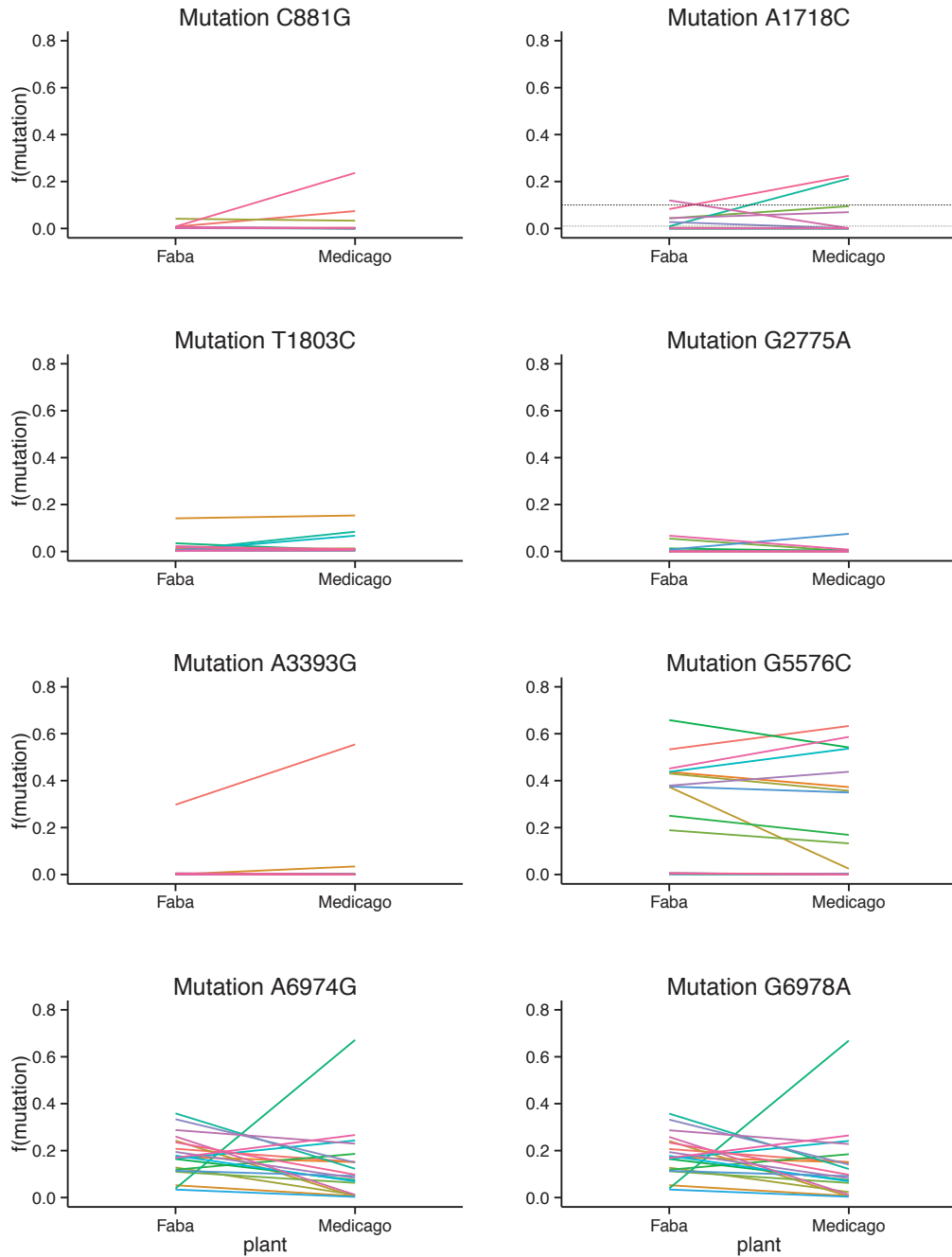


Figure S5: Frequency of each of the eight candidate mutations before (faba bean) and after (medicago) aphid transmission in twenty independent viral populations (Experiment 2).

Each viral population is represented with a specific color. All 20 populations are represented in all graphs; when less than 20 populations are visible, it is because several are superimposed. In most cases, when mutation frequencies were above zero in the medicago background, they were already above zero in the faba bean background, *i.e.* prior to the host switch (faba bean - medicago). This observation suggests that these mutations were not related to a genome formula change during host switching.

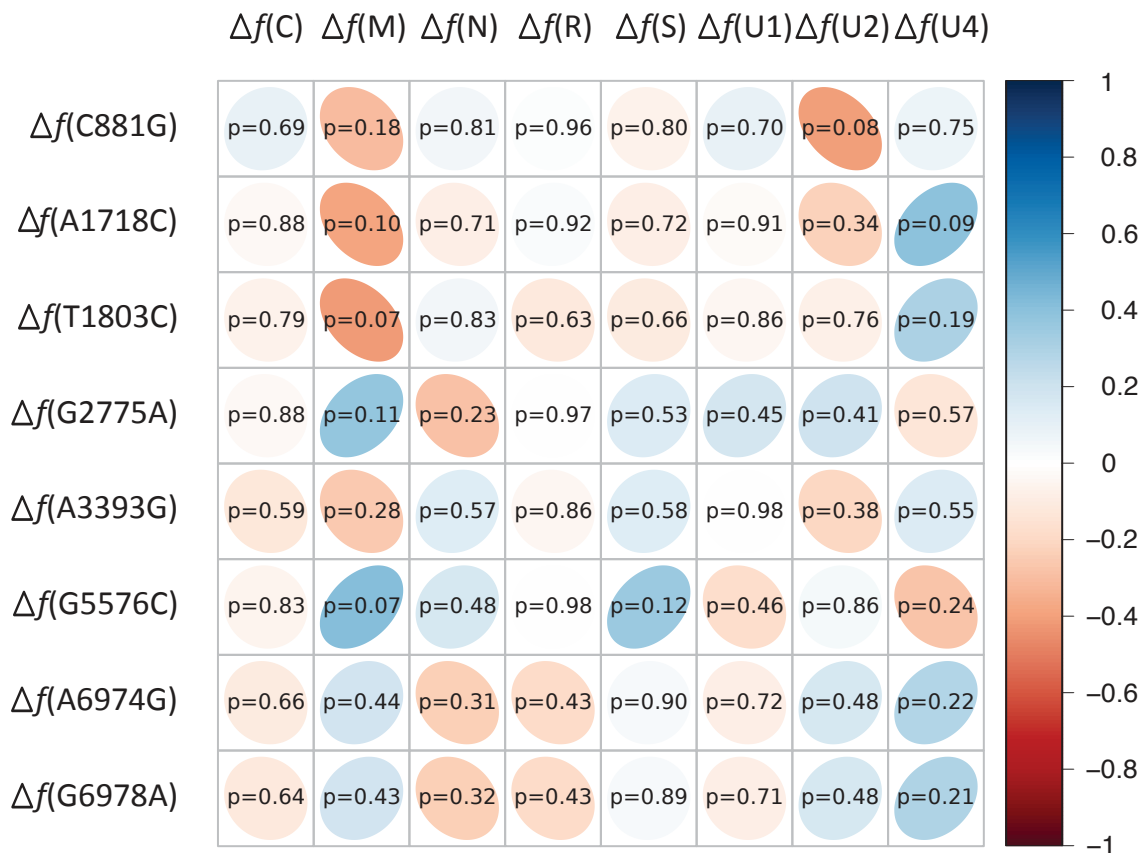


Figure S6: Correlation matrix confronting variations in mutation frequencies to variations in FBNSV segment frequencies.

Frequency variations are calculated between faba bean and medicago. Colors (see scale on the right) and ellipse shapes are function of correlation coefficient values. None of these correlations is significant even before multiple-tests correction.

Table S1: Correlations between the frequencies of FBNSV segments and their respective mRNA, in trial A and B of Experiment 1.

Cor refers to the Pearson correlation coefficient. '***', '**', and '*' correspond to p-values ≤ 0.001 , 0.01 , and 0.05 , respectively. All statistically significant correlations remain so after FDR correction.

Trial A	Faba bean			Medicago		
	Cor	p-value	significance	Cor	p-value	significance
C	0.95	2.34E-08	***	0.86	3.13E-09	***
M	0.80	0.000213	***	0.77	1.64E-06	***
N	0.70	0.00238	**	0.68	8.06E-05	***
R	0.86	2.19E-05	***	0.50	0.007391	**
S	0.39	0.1368		0.39	0.03802	*
U1	0.81	0.0001629	***	0.73	1.10E-05	***
U2	0.81	0.0001599	***	0.65	0.0001642	***
U4	0.85	2.79E-05	***	0.74	5.75E-06	***

Trial B	Faba bean			Medicago		
	Cor	p-value	significance	Cor	p-value	significance
C	0.87	2.48E-07	***	0.59	6.16E-03	**
M	0.70	4.60E-04	***	0.56	0.011	*
N	0.72	2.17E-04	***	0.25	0.29	
R	0.57	7.20E-03	**	-0.41	0.07	
S	0.41	0.06		0.13	0.59	
U1	0.17	0.45		0.82	1.18E-05	***
U2	0.65	1.34E-03	**	0.14	0.55	
U4	0.72	2.45E-04	***	0.55	0.01154	*

Table S2: Statistical analyses of the frequencies of the transcripts coded by the eight segments of FBNSV in Trial A and B of Experiment 1.

In each analysis a linear model using the factors “plant” (faba bean or medicago) and “DNA segment frequency” (f(DNA)) and their potential interaction, was used to explain the variations in mRNA frequencies. DNA and mRNA frequencies were logit-transformed. Statistically significant f(DNA):plant interactions are in bold.

Trial A

Segment C

Adjusted R²= 0.8583

	Df	Sum of squares	F value	Pr(>F)	
f(DNA)	1	9.5785	233.7388	<.0001	***
Plant	1	1.9576	47.7708	<.0001	***
f(DNA):plant	1	0.2269	5.5377	0.0236	*
Residuals	40	1.6392			

Segment M

Adjusted R²=0.6786

	Df	Sum of squares	F value	Pr(>F)	
f(DNA)	1	2.9026	87.3199	<.0001	***
Plant	1	0.0845	2.5421	0.1187	ns
f(DNA):plant	1	0.18713	5.6295	0.0226	*
Residuals	40	1.32964			

Segment N

Adjusted R²=0.7681

	Df	Sum of squares	F value	Pr(>F)	
f(DNA)	1	2.1566	60.9453	<.0001	***
Plant	1	0.0656	1.8538	0.1810	ns
f(DNA):plant	1	0.0138	0.3894	0.5361	ns
Residuals	40	1.4154			

Segment R

Adjusted R²=0.8534

	Df	Sum of squares	F value	Pr(>F)	
f(DNA)	1	3.6624	34.5188	<.0001	***
Plant	1	0.2635	2.4833	0.1229	ns
f(DNA):plant	1	0.8377	7.8957	0.0076	**
Residuals	40	4.2439			

Segment SAdjusted R²=0.7431

	Df	Sum of squares	F value	Pr(>F)	
f(DNA)	1	0.2673	6.3005	0.0162	*
Plant	1	0.1980	4.6671	0.0368	*
f(DNA):plant	1	0.0085	0.2004	0.65681	ns
Residuals	40	1.6967			

Segment U1Adjusted R²=0.6132

	Df	Sum of squares	F value	Pr(>F)	
f(DNA)	1	1.9767	57.5599	<.0001	***
Plant	1	0.4841	14.0955	0.0006	***
f(DNA):plant	1	0.3195	9.3045	0.0040	**
Residuals	40	1.3737			

Segment U2Adjusted R²=0.4197

	Df	Sum of squares	F value	Pr(>F)	
f(DNA)	1	8.4414	9.3042	0.0040	***
Plant	1	15.7138	17.3198	0.0002	***
f(DNA):plant	1	2.569	2.8317	0.1002	ns
Residuals	40	36.291			

Segment U4Adjusted R²=0.7001

	Df	Sum of squares	F value	Pr(>F)	
f(DNA)	1	2.6459	62.7075	<.0001	***
Plant	1	3.8602	91.4879	<.0001	***
f(DNA):plant	1	0.1263	2.9927	0.0913	ns
Residuals	40	1.6877			

Trial B**Segment C**Adjusted R²=0.7609

	Df	Sum of squares	F value	Pr(>F)	
f(DNA)	1	1.8965	67.8527	<.0001	***
Plant	1	0.1599	5.7234	0.0219	*
f(DNA):plant	1	0.2147	7.6816	0.0087	**
Residuals	37	1.0342			

Segment MAdjusted R²=0.4773

	Df	Sum of squares	F value	Pr(>F)	
f(DNA)	1	1.5601	26.2093	<.0001	***
Plant	1	0.6708	11.2687	0.0018	**
f(DNA):plant	1	0.0249	0.4182	0.521852	ns
Residuals	37	2.2025			

Segment NAdjusted R²=0.6419

	Df	Sum of squares	F value	Pr(>F)	
f(DNA)	1	0.8274	14.7089	0.0005	***
Plant	1	0.0343	0.6099	0.4398	ns
f(DNA):plant	1	0.1017	1.8081	0.1869	ns
Residuals	37	2.0813			

Segment RAdjusted R²=0.4817

	Df	Sum of squares	F value	Pr(>F)	
f(DNA)	1	0.1896	1.9087	0.1754	ns
Plant	1	0.0687	0.6912	0.4111	ns
f(DNA):plant	1	1.2096	12.1779	0.0013	**
Residuals	37	3.6752			

Segment SAdjusted R²=0.0598

	Df	Sum of squares	F value	Pr(>F)	
f(DNA)	1	0.1136	1.2808	0.2650	ns
Plant	1	0.0553	0.6241	0.4346	ns
f(DNA):plant	1	0.0257	0.2902	0.5933	ns
Residuals	37	3.2813			

Segment U1Adjusted R²=0.4662

	Df	Sum of squares	F value	Pr(>F)	
f(DNA)	1	0.4559	17.1833	0.0002	***
plant	1	0.2159	8.1374	0.0071	**
f(DNA):plant	1	0.1717	6.4733	0.0153	*
Residuals	37	0.9816			

Segment U2Adjusted R²=-0.0259

	Df	Sum of squares	F value	Pr(>F)	
f(DNA)	1	0.2955	0.4151	0.5234	ns
plant	1	0.1113	0.1563	0.6948	ns
f(DNA):plant	1	0.1125	0.1581	0.6932	ns
Residuals	37	26.3441			

Segment U4Adjusted R²=0.8521

	Df	Sum of squares	F value	Pr(>F)	
f(DNA)	1	3.1457	42.8522	<.0001	***
Plant	1	13.8191	188.2513	<.0001	***
f(DNA):plant	1	0.1273	1.7341	0.196	ns
Residuals	37	2.7161			

Table S3: Statistical analysis of the variation of mRNA concentrations (Experiment 1).

In this mixed linear model, segment concentration (conDNA), the nature of the segment (e.g. C,M, N, etc.), host plant species (faba bean or medicago) and all their two- and three- ways interactions were used as fixed factors to explain variation in mRNA concentrations. The identity of each replicate plant (ident) was used as a random factor to account for variation across plants in DNA or mRNA concentration due to uncontrolled effects. The DNA and mRNA concentrations were transformed following the Sb-Johnson distribution before carrying the analysis to comply with linear model assumptions. The distribution parameters were respectively:

Trial A (early trial): conmRNA: shape $\gamma = 3.4508903$; shape $\delta = 0.9486361$; location $\theta = -5.065e-7$; scale $\sigma = 0.0002305$; conDNA: shape $\gamma = 2.9149166$; shape $\delta = 0.7857954$; location $\theta = -1.401e-7$; scale $\sigma = 0.000251$

Trial B (late trial): conmRNA: shape $\gamma = 2.5936667$; shape $\delta = 0.5375439$; location $\theta = 4.0249e-9$; scale $\sigma = 0.0005025$; conDNA: shape $\gamma = 1.9210207$; shape $\delta = 0.5846782$; location $\theta = 3.428e-10$; scale $\sigma = 9.9888e-5$.

Goodness of fit tests of the transformed variables to normal distributions did not reject H0 in all cases but for conmRNA in the trial A, where the transformed distribution was nevertheless unimodal and symmetrical.

Trial A

Model adjusted $R^2 = 0.9508$

Fixed Effect Tests

Source	Nparm	DF	DFDen	F Ratio	Prob > F	
Plant	1	1	36.72	18.4144	0.0001	***
Segment	7	7	280.3	255.8491	<.0001	***
conDNA	1	1	318	191.2425	<.0001	***
plant*segment	7	7	280.3	23.1735	<.0001	***
plant*conDNA	1	1	318	3.6701	0.0563	ns
segment*conDNA	7	7	273.6	3.1134	0.0035	**
plant*segment* conDNA	7	7	273.6	1.7285	0.1023	ns

REML Variance Component Estimates

Random effect	Variance component	Std Error	95% lower	95% upper	Wald p-value	% of total
ident	0.3382	0.0809	0.1797	0.4968	<.0001	85.664
Residual	0.0566	0.0048	0.0482	0.0675		14.336
Total	0.3948	0.0808	0.2744	0.6169		100.000

Trial B

Model adjusted $R^2 = 0.9638$

Fixed Effect Tests

Source	Nparm	DF	DFDen	F Ratio	Prob > F	
plant	1	1	43.56	60.4989	<.0001	***
segment	7	7	270.3	197.1725	<.0001	***
conDNA	1	1	173.9	49.9111	<.0001	***
plant*segment	7	7	270.3	11.1661	<.0001	***
plant*conDNA	1	1	173.9	17.5542	<.0001	***
segment*conDNA	7	7	258	2.7014	0.0102	**
plant*segment*conDNA	7	7	258	0.8359	0.5583	ns

REML Variance Component Estimates

Random effect	Variance component	Std Error	95% lower	95% upper	Wald p-value	% of total
ident	0.1188	0.0291	0.0617	0.1759	<.0001	74.122
Residual	0.0415	0.0037	0.0351	0.0497		25.878
Total	0.1603	0.0292	0.1155	0.2375		100.000

Table S4: Statistical analysis of the distance between DNA and between mRNA formulas in faba bean and medicago (Experiment 1, Trial B).

The nature of the nucleic acid (acnuc), DNA or mRNA, was a fixed factor. We used the individual plant, faba bean or medicago, and its interaction with the nucleic acid as random factors to account for pseudoreplication. See main text for more explanations.

Model adjusted $R^2 = 0.9372$

Fixed Effect Tests

Source	Nparm	DF	DFDen	F Ratio	Prob > F	
acnuc	1	1	35.04	55.1030	<.0001	***

REML Variance Component Estimates

Random effect	Variance component	Std Error	95% lower	95% upper	Wald p-value	% of total
faba	0.0075	0.0029	0.0018	0.0132	0.0104	41.968
medic	-0.0008	0.0011	-0.0029	0.0013	0.4744	0.000
acnuc*faba	0.0031	0.0010	0.0011	0.0051	0.0022	17.564
acnuc*medic	0.0053	0.0017	0.0019	0.0087	0.0024	29.656
Residual	0.0019	9.9085e-5	0.0018	0.0021		10.812
Total	0.0179	0.0034	0.0127	0.0270		100.000

Liste communications Orales et publications

- **Jérémy Di Mattia, Faustine Ryckebusch, Marie-Stéphanie Vernerey, Elodie Pirolles, Nicolas Sauvion, Michel Peterschmitt, Jean-Louis Zeddiam, Stéphane Blanc** 2020. Co-Acquired Nanovirus and Geminivirus Exhibit a Contrasted Localization within Their Common Aphid Vector *Viruses*, **12**, pp.299, <https://hal.inrae.fr/hal-02561749/document>.
- **Jérémy Di Mattia, Marie-Stéphanie Vernerey, Michel Yvon, Elodie Pirolles, Mathilde Villegas, Yahya Gaafar, Heiko Ziebell, Yannis Michalakis, Jean-Louis Zeddiam, Stéphane Blanc** 2020. Route of a Multipartite Nanovirus across the Body of Its Aphid Vector *Journal of Virology*, **94**, pp.e01998-19.
- **Stéphane Blanc, Romain Gallet, Jérémy Di Mattia, Sébastien Ravel, Renaud Vitalis, Yannis Michalakis** 2019. Gene copy number variation impacts on gene expression in a multipartite virus.
- **Stéphane Blanc, Jérémy Di Mattia, Michel Yvon, Marie-Stéphanie Vernerey, Elodie Pirolles, Jean Louis Zeddiam** 2018. On the mechanisms of circulative non-propagative transmission of nanoviruses, **108 Issue: 10 Supplement: S**.
- **Stéphane Blanc, Elodie Pirolles, Romain Gallet, Anne Sicard, Jérémy Di Mattia, Marie-Stéphanie Vernerey, Michel Yvon, Serafin Gutierrez, Yannis Michalakis** 2018. A multicellular lifestyle for a multipartite virus.
- **Stéphane Blanc, Romain Gallet, Anne Sicard, Jérémy Di Mattia, Yannis Michalakis** 2017. The lifestyle of a multipartite virus challenges major paradigms in Virology.
- **Jérémy Di Mattia, Marie-Stéphanie Vernerey, Michel Yvon, Elodie Pirolles, Jean-Louis Zeddiam, Stéphane Blanc** 2018. Suivi du Faba Bean Necrotic Stunt Virus dans son insecte vecteur *Acyrtosiphon pisum* *Rencontre BAPOA 2018*.
- **Jérémy Di Mattia, Faustine Ryckebusch, Jean-Louis Zeddiam, Stéphane Blanc** 2019. Search for protein-protein interactions between Faba bean necrotic stunt virus and its aphid vector *Aphis craccivora* using a split-ubiquitin yeast two-hybrid screening. *17em Rencontres de virologie végétale*.
- **Faustine Ryckebusch, Martine Granier, Jeremy Di Mattia, Jean-Louis Zeddiam, Nicolas Sauvion, Michel Peterschmitt** 2019. Characterization of the Transmission of Alfalfa leaf curl virus, an Aphid-transmitted Geminivirus *9th International Geminivirus Symposium and 7th International ssDNA Comparative Virology Workshop*.
- **Jérémy DI MATTIA, Faustine RYCKEBUSCH, Jean-Louis ZEDDAM, Michel PETERSCHMITT, Nicolas SAUVION, Stéphane BLANC** 2019. Faba bean necrotic stunt virus (Family Nanoviridae, genus Nanovirus) and Alfalfa leaf curl virus (Family Geminiviridae, genus Capulavirus) interactions within co-infected plants and co-transmitting aphid vector. *9th International Geminivirus Symposium and 7th International ssDNA Comparative Virology Workshop*.

Mécanismes cellulaires et moléculaires de l'interaction nanovirus-insecte vecteur

Les virus de plantes sont majoritairement transmis par des insectes vecteurs. La compréhension de l'interaction entre les phytovirus et leurs vecteurs est l'une des clés pour le contrôle des maladies qu'ils causent. Les travaux de ma thèse portent sur l'interaction entre un virus appartenant à la famille *Nanoviridae*, l'espèce *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV) et ses pucerons vecteurs. Les nanovirus possèdent une architecture génomique multipartite c'est-à-dire que leur génome est divisé en plusieurs segments, chacun étant encapsidé individuellement dans une particule virale. Tout comme les lutéo- et geminivirus, les nanovirus sont transmis suivant le mode circulant non multipliant: le virus ingéré traverse la barrière intestinale, transite dans l'hémolymphe et passe dans les glandes salivaires du puceron sans aucune réplication. Il a été précédemment établi que la transmission du FBNSV, met en jeu un facteur assistant, la protéine virale NSP (Nuclear shuttle protein).

A l'aide de la microscopie confocale, nous avons montré que les composants viraux nécessaires à la transmission (ADN, protéine de capsid (CP) et NSP) s'accumulent dans les cellules de l'intestin moyen antérieur (AMG) et dans certaines cellules des glandes salivaires principales (PSG) du puceron. Les 8 segments du FBNSV, la CP ainsi que la NSP s'accumulent au sein des mêmes agrégats cytoplasmiques périnucléaires dans ces cellules. Nous avons alors étudié plus précisément ces agrégats, en recourant à différentes techniques, en particulier la microscopie confocale, la microscopie électronique et le double hybride, afin de mieux définir les voies de transport subcellulaire que le FBNSV emprunte. En collaboration avec une étudiante en thèse dans l'équipe qui menait des travaux similaires sur un geminivirus (*Alfalfa leaf curl virus*) transmis par pucerons, nous avons pu démontrer que nano et geminivirus suivent des voies intracellulaires distinctes chez leur vecteur commun.

Certains segments génomiques du FBNSV pouvant être omis lors de l'inoculation sans pour autant abolir l'infection systémique, nous avons démontré que la transmission par vecteur pouvait reconstituer des génomes complets à partir de différentes plantes infectées chacune par des génomes incomplets. La reconstitution des génomes complets peut avoir lieu soit au sein d'un seul individu vecteur, soit dans une nouvelle plante inoculée par deux individus vecteurs chacun apportant son lot de segments complémentaire.

Enfin, ces travaux ont révélé pour la première fois, qu'un facteur assistant de la transmission peut assurer sa fonction même lorsqu'il est acquis plusieurs jours après les particules virales. Ce résultat original ouvre de nouvelles perspectives quant au mode d'action des facteurs assistants de la transmission par vecteur et nous les avons mises en contexte et discutées dans un article de synthèse portant sur ce domaine de recherche

Mots-clés : Nanovirus, FBNSV, puceron, transmission, facteur assistant à la transmission, microscopie confocale.

Cellular & molecular mechanisms of nanovirus-insect vector interaction

Most plant viruses are transmitted by vectors and deciphering the virus-vector interactions is one of the keys to control the corresponding diseases. My PhD work focuses on the interaction between a virus of the family *Nanoviridae*, the species *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV), and its aphid vectors. Nanoviruses have a multipartite genomic architecture, i.e. their genome is divided into several segments, each of which is individually encapsidated in a viral particle. Just like better-known luteo- and geminiviruses, nanoviruses are transmitted in a circulative non-propagative manner. This means that the virus crosses the intestinal barrier, transits into the hemolymph and passes into the salivary glands of the aphid without replication. It has previously been established that FBNSV requires a helper component (HC) for aphid transmission, and that this HC is the viral protein NSP.

Using confocal microscopy, we established that the viral components involved in aphid-transmission (DNA, capsid protein (CP), and NSP) accumulate in the aphid midgut (AMG) and in specific cell types of the principal salivary glands (PSG). There, the 8 segments of FBNSV, the proteins CP and NSP transit together and accumulate within the same perinuclear cytoplasmic aggregates. We then further studied the subcellular pathway supporting the FBNSV transcytosis within aphids, using a wide range of techniques from confocal and electron microscopy to Yeast 2 Hybrid system. In collaboration with another PhD student of the group tackling similar questions on a geminivirus transmitted by aphids (ALCV), we could show that nano- and geminiviruses appear to follow distinct intracellular pathways within their common vector.

It was previously known that some genome segments of nanoviruses can be omitted at inoculation without totally impairing systemic infection of host plants. We here demonstrate that vector transmission can reconstitute the full FBNSV genome from distinct plants, each infected with complementary incomplete sets of genome segments. The reconstitution can occur either within individual aphids acquiring segments sequentially, or within plants inoculated by distinct aphids carrying distinct FBNSV genome segments sets.

Finally, this PhD work revealed for the first time that a HC (NSP) can function even when acquired days after the acquisition of virus particles. This original result opens new perspective on the mode of action of HCs, and we set these into the context of this research field in a review article.

Key words : Nanovirus, FBNSV, aphid, transmission, helper factor, confocal microscopy.